

ALEXANDRA MITIRU WATANABE

**PREVALÊNCIA DA ANEMIA FALCIFORME
NO ESTADO DO PARANÁ**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre, ao Curso de Pós-Graduação em Medicina Interna, Departamento de Clínica Médica, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

**Orientador:
Prof. Dr. José Zanis Neto**

**Co-orientadora:
Prof.^a Dr.^a Mara Albonei Dudeque Pianovski**

CURITIBA

2007

Watanabe, Alexandra Mitiru
Prevalência da anemia falciforme no estado do Paraná. / Alexandra
Mitiru Watanabe. Curitiba, 2006.
122 f.

Orientador: Prof. Dr. José Zanis Neto Co-orientadora: Profª Drª Mara
Albonei Dudeque Pianovski

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Medicina
Interna. Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

1. Anemia falciforme - Prevalência. 2. Triagem neonatal. I. Título. II.
Zanis Neto, José



PARECER

Aos dezoito dias do mês de março do ano de dois mil e sete, a banca examinadora constituída pelos **Professores Doutores Paulo César Naoum, Dra. Mara Albonei Dudeque Pianovski e Dra. Eliane Mara Cesário Pereira Maluf**, exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por **Alexandra Mitiru Watanabe**, do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saúde – Mestrado e Doutorado**, da **Universidade Federal do Paraná**, intitulada: **“PREVALÊNCIA DA ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DO PARANÁ”**.

A Banca examinadora considerou que Alexandra Mitiru Watanabe apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina** e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.


Curitiba, 19 de março de 2007.



Prof. Dr. Paulo César Naoum



Profa Dra. Mara Albonei Dudeque Pianovski



Profa. Dra. Eliane Mara Cesário Pereira Maluf

AGRADECIMENTOS

Essa pesquisa não é mérito de uma pessoa, mas sim do trabalho conjunto de muitos profissionais que no dia a dia, anonimamente, ajudam a melhorar a vida de tantas outras. Assim, agradeço a todos, sem exceção e também:

- À Deus Pai, ao Deus Filho e ao Espírito Santo porque "tudo é possível se você crê em DEUS";
- À minha mãe Miyoko, por ser a principal e primeira estimuladora para eu iniciar esta caminhada; meus irmãos Julieta (e cunhado Gehard), Henrique e Beatriz;
- Dr. José Zanis Neto, que prontamente confiou e aceitou orientar-me nesta pesquisa;
- Dr.^a Mara Albonei Dudeque Pianovski, co-orientadora que com firmeza, delicadeza e cuidados na correção e direcionamento, orientou-me nesta fascinante jornada dentro da anemia falciforme. Meu agradecimento especial, pela amizade e por me acompanhar até a finalização dessa pesquisa.
- Prof.^a Eliane Maluf, pelas orientações e sugestões nos dados epidemiológicos,
- Dr. Ehrenfried Ottmar Wittig, Diretor do SRTN da FEPE, responsável pelo "Teste do Pezinho" no Estado do Paraná, pela dedicação da sua vida à triagem neonatal e pelas sugestões na finalização dessa pesquisa,
- Bioquímica Mousseline T. Domingos, coordenadora do laboratório de triagem neonatal da FEPE, pelo apoio e por sugerir as hemoglobinopatias para o início dessa jornada;
- Bioquímicas Regina e Marta, pelas longas conversas, discussões de casos e pelas "injeções" de ânimo em tantos momentos dessa jornada.
- Bioquímicas Cida e Patrícia; técnicas de laboratório: Nair, Márcia, Mari, Luiza, Dayane, Kassia, Francieli, secretárias Cirlene, Daiane, e secretário Maurício, e todos(as) técnicas(os) de informática da FEPE;

- Digitador Osny Osires Cardoso e analista de sistemas Adinã V. Rocha por auxiliar no acesso a dados cadastrais dos pacientes detectados pela Triagem Neonatal.
- Cleuza, Simone, Adriane e todo o corpo do Serviço Social do SRTN-FEPE, pela procura ativa dos pacientes que são encaminhados para consulta médica no HC.
- Dr.^a Leniza, Dra Fabíola, Dr. Emerson, médicos pediatras da "Casa Verde" do HC, por disponibilizar os prontuários e dados dos pacientes em consulta médica.
- Às técnicas de laboratório de hematologia do HC, Terezinha Iraci Zaborowski e Sonia Maria Lissa pela realização dos exames confirmatórios dos pacientes encaminhados para o ambulatório de hemato-pediatria do HC.
- À Dr.^a Eleidi Freire-Maia, pelas orientações e explicações sobre a genética das populações;
- Ao estatístico Cleibson Almeida por auxiliar nos testes estatísticos.
- À Dr.^a Mariza Saito e Dr.^a Denise Mashima, de Londrina, pelas crianças que fazem o acompanhamento naquela cidade
- Aos farmacêuticos Cristina e Romir, pela localização das crianças que estavam "perdidas".
- Às enfermeiras, auxiliares de enfermagem assistentes sociais das 22 Regionais de Saúde do Estado do Paraná, que prontamente localizam as crianças quando solicitado pelo SRTN- FEPE.
- Ao colegas e amigos do HEMEPAR, que entenderam as minhas ausências, em especial ao Rogério, Beth, Fabiane e Fátima.
- À Dr.^a Anália, chefe da Divisão de Produção do Hemepar, pelo apoio recebido.
- Aos colegas do mestrado, Daniela Piloneto, Giane Mira, Débora Smith, Furlan ("os Jackson's Five"), Aline Freund.
- Às secretárias do Programa de Mestrado da Clínica Médica - Medicina Interna, Valéria e Lúcia.
- Ao Prof. Dr. Erasmo Gruginski, pela revisão gramatical e,

- À Léia Rachel Castellar, pela formatação da dissertação.
- À amiga e designer Yolanda Shimizu, pela paciência nas idas e vindas na elaboração dos mapas.
- A todos que de maneira direta ou indireta participam de atividades na área da saúde que possibilitaram a realização deste trabalho.
- Em especial aos pacientes portadores da anemia falciforme e β -talassemia, com a esperança que essa pesquisa possa, de alguma maneira, contribuir para a melhoria nas suas vidas.

*The best and most beautiful things in life cannot be seen
or even touched... they must be felt with the heart.*

(Helen Keller)

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	4
1.2 OBJETIVOS	6
1.2.1 Objetivo Geral	6
1.2.2 Objetivos Específicos	6
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 ORIGEM HISTÓRICA DA HbS NO BRASIL	7
2.2 CLASSIFICAÇÃO RACIAL.....	9
2.3 HEMOGLOBINA NORMAL	11
2.4 HEMOGLOBINA VARIANTE.....	12
2.4.1 Célula Falciforme.....	14
2.4.1.1 Histórico da célula falciforme	14
2.4.1.2 Haplótipos da hemoglobina S	16
2.4.1.3 Anemia falciforme – etiologia da doença	16
2.4.1.4 Mecanismo da falcização	17
2.5 ANEMIA FALCIFORME E SINTOMAS CLÍNICOS	20
2.5.1 Vasoclusão	20
2.5.2 Crises Dolorosas	20
2.5.3 Sequestro Esplênico.....	21
2.5.4 Síndrome Torácica Aguda	21
2.5.5 Febre	22
2.5.6 Acidente Vascular Cerebral.....	22
2.5.7 Priapismo.....	22
2.5.8 Úlcera de Perna.....	23

2.5.9	Anemia.....	23
2.6	ATRASSO NO DESENVOLVIMENTO	25
2.7	PROFILAXIA E TRATAMENTO	26
2.7.1	Hidroxiuréia.....	27
2.7.2	Butiratos.....	28
2.8	TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA.....	28
2.9	PORTADOR SADIO DA HbS - DOAÇÃO DE SANGUE.....	29
2.10	DETECÇÃO PRECOCE DA ANEMIA FALCIFORME NO RECÉM-NASCIDO.....	31
2.10.1	Programas de Triagem Neonatal.....	32
2.10.2	Inclusão das Hemoglobinopatias no PTN.....	35
2.11	COLETA DA AMOSTRA	36
2.12	USO DE ANTICOAGULANTES	38
2.13	TÉCNICAS PARA A PESQUISA DAS HEMOGLOBINOPATIAS	38
2.13.1	Eletroforese em pH Alcalino e �cido	40
2.13.2	Teste de Solubilidade	40
2.13.3	Focalização Isoelétrica	42
2.13.4	HPLC	45
2.13.5	Biologia Molecular	47
3	TÉCNICAS UTILIZADAS NA TRIAGEM NEONATAL	48
4	FEPE: SERVIÇO DE REFERÊNCIA EM TRIAGEM NEONATAL.....	50
4.1	PROTOCOLO PARA A TRIAGEM DAS HEMOGLOBINOPATIAS - FEPE- SRTN....	51
4.1.1	Coleta de Amostra e Ficha de Coleta.....	51
4.1.2	Problemas na Coleta da Amostra de Sangue	51
4.2	RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS E REGISTRO NO SRTN	52
4.3	LABORATÓRIO DO SRTN	52
4.3.1	Focalização Isoelétrica	52
4.3.2	Leitura e Interpretação do Gel.....	53
4.3.3	Cromatografia de Alta Precisão - HPLC	55
4.3.4	Leitura e Interpretação do HPLC	55
4.3.5	Interpretação dos Resultados da Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias.....	56
4.3.5.1	Falsos positivos e falsos negativos	58

5	PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A DEFINIÇÃO DO DIAGNÓSTICO	60
6	CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS.....	61
6.1	POPULAÇÃO	61
6.2	CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO	62
6.3	AMOSTRA DA PESQUISA	63
6.3.1	Crítérios de Inclusão	63
6.3.2	Crítérios de Exclusão.....	63
7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
8	RESULTADOS	65
8.1	DISTRIBUIÇÃO DA ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DO PARANÁ.....	65
8.2	DISTRIBUIÇÃO DA ASSOCIAÇÃO S β -TALASSEMIA NO ESTADO DO PARANÁ	67
8.3	DISTRIBUIÇÃO DO HETEROZIGOTO DA HbS NO ESTADO DO PARANÁ	68
8.4	CLASSIFICAÇÃO DO HETEROZIGOTO FAS POR COR DA PELE.....	69
9	DISCUSSÃO	71
9.1	PREVALÊNCIA DA HbS EM HOMOZIGOSE NO ESTADO DO PARANÁ.....	71
9.2	ANEMIA FALCIFORME – TEOREMA DE HARDY-WEINBERG	72
9.2.1	Seleção.....	73
9.2.2	Casamentos Inter-Étnicos	75
9.2.3	Erros Técnicos e Diagnósticos	76
9.3	FREQUÊNCIA DO HETEROZIGOTO NO ESTADO DO PARANÁ - COR DA PELE.....	76
9.4	FREQUÊNCIA DA HEMOGLOBINA "S" NOS PTN BRASILEIROS	77
9.5	INTERAÇÃO S β -TALASSEMIA	81
9.6	MISCIGENAÇÃO	81
9.7	CLASSIFICAÇÃO POR COR DA PELE.....	82
9.8	TRIAGEM NEONATAL.....	83
9.9	CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DOS TESTES PRESUNTIVO E CONFIRMATÓRIO	84
9.10	SAÚDE PÚBLICA.....	85
10	CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	89

APÊNDICE 1 - EXAMES HEMATOLÓGICOS DOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SS OU Sβ, DIAGNÓSTICADOS A PARTIR DA TRIAGEM NEONATAL PERÍODO 2002-2004	102
APÊNDICE 2 - REGIONAIS DE SAÚDE COM SEUS MUNICÍPIOS - RN COM FENÓTIPOS FAS	105
ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA (CEPE)	116
ANEXO 2 - FICHA DE COLETA DE SANGUE/PAPEL FILTRO - "TESTE DO PEZINHO"	117
ANEXO 3 - TESTES ESTATÍSTICOS - TESTE DE MCNEMAR	118
ANEXO 4 - TESTES ESTATÍSTICOS - TESTE DE KRUSKAL WALLIS	119
ANEXO 5 - TEOREMA HARDY-WEINBERG	121
ANEXO 6 - CÁLCULO DO N.º DE CASOS SS PELO TEOREMA DE HARDY-WEINBERG	122

LISTA DE TABELAS

1	ONTOGENIA DAS HEMOGLOBINAS	12
2	RESULTADOS PRESUNTIVOS DA TRIAGEM NEONATAL E DIAGNÓSTICOS POSSÍVEIS	58
3	REGIONAIS DE SAÚDE E SEUS MUNICÍPIOS	62
4	COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS PRESUNTIVOS DA TRIAGEM NEONATAL E OS EXAMES CONFIRMATÓRIOS PARA HOMOZIGOSE SS REALIZADOS A PARTIR DE 6 MESES (N=12).....	65
5	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM HOMOZIGOSE (SS), POR REGIONAL DE SAÚDE E CIDADE.....	66
6	COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS PRESUNTIVOS DA TRIAGEM NEONATAL E OS EXAMES CONFIRMATÓRIOS PARA OS PACIENTES COM INTERAÇÃO S β (N=15).....	66
7	DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE INTERAÇÃO S β -TALASSEMIA, POR REGIONAL DE SAÚDE E CIDADE	67
8	DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS QUANTO À COR DA PELE.....	68
9	CLASSIFICAÇÃO COR DA PELE X HETEROZIGOTOS FAS.....	69
10	PREVALÊNCIA DA HEMOGLOBINA "S" NO ESTADO DO PARANÁ.....	70
11	FREQÜÊNCIAS HAPLOTÍPICAS (fh) HLA A-B NA POPULAÇÃO DAS REGIÕES DE CURITIBA E NORTE/NORDESTE DO ESTADO DO PARANÁ	72

LISTA DE FIGURAS

1	HEMÁCIA FALCIZADA.....	18
2	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVIDADE DO CANAL DE GARDOS NA HEMÁCIA FALCIFORME	19
3	TESTE DE SOLUBILIDADE REALIZADO EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL - AMOSTRA REPRESENTATIVA DOS RECÉM-NASCIDOS	42
4	PROPRIEDADES ANFOTÉRICAS DO AMINOÁCIDO.....	43
5	CUBA E FONTE PARA FIE.....	45
6	HPLC	46
7	GEL OBTIDO POR FIE –HEMOGLOBINAS	54
8	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS PACIENTES SS E Sß NO ESTADO DO PARANÁ - 2002- 2004	67
9	DISTRIBUIÇÃO DOS HETEROZIGOTOS FAS NO ESTADO DO PR POR MUNICÍPIO - 2002-2004.....	69

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

APAE	- Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais
BAMOPAR	- Banco de doadores voluntários de medula óssea do Paraná
CDC	- Center of Disease Control
CEPE	- Centro de Pesquisas
DATASUS	- Banco de Dados do Sistema Único de Saúde
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
DNV	- Dados dos Nascidos Vivos
2,3 DPG	- 2,3 di fosfo glicerato
EDTA	- Ácido etilenodiaminotetracético
FAS	- Hemoglobina fetal, normal A e Hemoglobina S
FEPE	- Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional
FS	- Hemoglobina fetal /hemoglobina S
GAG	- Ácido glutâmico
g/dl	- Gramas por decilitro
GTG	- Valina
HbA	- Hemoglobina A
HbC	- Hemoglobina C
HbF	- Hemoglobina fetal
HbM	- Hemoglobina M
HbS	- Hemoglobina S
HC	- Hospital de Clínicas
HLA	- Antígeno de histocompatibilidade
Hmg	- Hemograma
HU	- Hospital universitário
IBGE	- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IEF	- Focalização Isoelétrica
IRT	- Imunotripsina reativa
K ² HPO ₄	- Fosfato ácido dipotássico
NIH	- National Institute of Health
NNSGRC	- National Newborn screening and genetics resource center
NUPAD	- Núcleo de ações e pesquisa em apoio diagnóstico
kg	- Kilogramas
KH ₂ PO ₄	- Fosfato diácido de potássio
LACEN	- Laboratório Central do Estado
MS	- Ministério da Saúde
Na ₂ S ₂ O ₄	- Ditionito de sódio

OMS	- Organização Mundial da Saúde
PCR	- Reação de cadeia polimerase
pH	- Potencial hidrogeniônico
PHHF	- Persistência hereditária de hemoglobina fetal
pI	- Ponto isoelétrico
PNTN	- Programa Nacional de Triagem Neonatal
Priv.	- Privado
PTN	- Programa de Triagem Neonatal
Pub.	- Público
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RN	- Recém-nascido
SRTN	- Serviço de Referência em Triagem Neonatal
ST	- Sangue total
TCA	- Ácido tricloroacético
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UNICAMP	- Universidade de Campinas
μl	- Microlitros

RESUMO

Introdução: A anemia falciforme é a doença genética de maior prevalência mundial e a que apresenta maior gravidade clínica e hematológica. No Brasil, devido a diferentes origens raciais e diversificado grau de miscigenação, a doença tornou-se um problema de Saúde Pública. A inclusão da pesquisa das hemoglobinopatias com ênfase na anemia falciforme nos programas de triagem neonatal foi um avanço para a saúde pública. A criação do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), mediante a Portaria n.º 822 do Ministério da Saúde, em 06/06/2001, está possibilitando a detecção das doenças falciformes no recém-nascido (RN), podendo-se iniciar precocemente a profilaxia e o tratamento, antes do surgimento dos sintomas. **Objetivos:** Determinar a prevalência da anemia falciforme; da associação S β -talassemia e do heterozigoto para a HbS. Comparar o genótipo obtido pela triagem neonatal com o genótipo obtido após os exames confirmatórios. Identificar as amostras selecionadas SS, S β -talassemia e FAS quanto às suas distribuições geográficas nas vinte e duas Regionais de Saúde do Estado do Paraná. **Casuística, material e métodos:** O estudo realizado foi observacional transversal. A população analisada foi constituída de 548.810 recém-nascidos que realizaram a triagem neonatal no Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE), no Estado do Paraná, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004. Foram selecionados os genótipos FS, FSA e (F)AS, resultantes da triagem por focalização isoelétrica (FIE) e cromatografia líquida de alta precisão (HPLC). As crianças com os genótipos FS ou FSA foram encaminhadas para acompanhamento clínico. Os exames laboratoriais eletroforese de hemoglobinas, pesquisa de HbA₂, Hb fetal e hemograma foram realizados a partir dos seis meses de idade para confirmação do diagnóstico. Os resultados obtidos foram analisados quanto à sua prevalência e distribuição nas Regionais de Saúde do Paraná. **Resultados:** Dos 548.810 recém-nascidos triados no período, 27 foram encaminhados para consulta médica por genótipo FS ou FSA. Desses, 12 (44,4%) confirmaram ser SS e 15 (55,5%) apresentaram a associação S β -talassemia. A prevalência da anemia falciforme detectada pela triagem neonatal no Estado do Paraná é de 2,2: 100.000 RN; S β -talassemia 2,7:100.000 RN e (F)AS 1.500: 100.000. A maior concentração de ambos os casos aconteceu na região norte e capital. Houve concordância do diagnóstico presuntivo com os exames confirmatórios em 93 % dos casos. O genótipo (F)AS encontra-se presente na quase totalidade do Estado porém em maior frequência na região norte. **Conclusões:** A prevalência de homozigotos e heterozigotos para HbS no Paraná é menor do que relatado para estados do centro-oeste, norte e nordeste do Brasil. Fatores como tipo de população predominante, óbitos fetais, casamentos inter-étnicos podem estar contribuindo para que não haja maior número de homozigotos para a HbS. A detecção da associação S β -talassemia corrobora a participação dos povos europeus mediterrâneos na miscigenação da população do Estado.

ABSTRACT

Sickle cell anemia is the most prevalent genetic disease in the world and shows clinical and hematological severity. In Brazil, due to different origins and great miscigenation, the disease was considered a Public Health problem. The inclusion of sickle cell disease in the newborn (NB) screening test was an advance in the Public Health. The "Programa Nacional de Triagem Neonatal" (PNTN) established through the Ministry of Health Edict n.º 822, of 06/06/2001, is making possible the early detection of sickle cell disease in newborns, allowing prophylaxy and treatment, before the symptoms arise. **Purpose:** To establish the prevalence of sickle cell anemia, the association of S β -Thalassemia and of the heterozygoze to HbS in the State of Paraná, through newborn blood samples collected to Newborn Screening Program. To compare the genotype obtained between newborn screening and confirmatory tests. To identify the cases SS, S β -Thalassemia and (F)AS, in relation to their geographical distribution through the 22 Paraná's State Health Regional. **Casuistic, material and methods:** The study was observational and cross-sectional. All 548.810 newborns who underwent the screening test in the FEPE, from January 2002 to December 2004, were analysed. Samples with genotype FS, FSA and (F)AS obtained by isoelectricfocusing (IEF) and high pressure liquid cromatography (HPLC) were selected. Newborns with genotype FS and FSA were conducted to clinical follow-up. Laboratory tests such as hemoglobin electrophoresis, HbA2 and fetal detection and blood count were performed around the age of 6 months to confirm the diagnose. Results were analysed in relation to their prevalence and distribution through the 22 Paraná State Health Regional Units. **Results:** From 548.810 newborns screened during this period of time, 27 (genotype FS and FSA) were conducted to medical appointment and follow-up. Of this, 12 (44,4%) had the genotype SS confirmed and 15 (55,5%) showed the association S β -thalassemia. Prevalence of sickle cell anemia detected through the Newborn Screening Program, in the state of Paraná is 2,2: 100.000NB; S β -thalassemia is 2,7: 100.000NB and (F)AS is 1.500: 100.000NB. Sickle cell anemia and association S β -thalassemia, were both more prevalent in the northern region and in the Capital. In 93% of cases there was a match between the presuntype diagnose and confirmatory tests. Genotype (F)AS is present all over the State. However is more frequent in its northern region. **Conclusion:** The prevalence of HbS homozygozy and heterozygozy in the State of Paraná is smaller than what has been published in relation to the centerwest, north and northwest states in Brazil. Ethnic population, fetal deaths, inter-ethnic marriages can be the reason for small numbers of sickle cell anemia. The finding of the association S β -thalassemia strongly suggests that the mediterranean european persons married interracially in the State population.

1 INTRODUÇÃO

A hemoglobinopatia S (HbS) é a mais comum das anomalias estruturais da hemoglobina. Ainda que assintomática no heterozigoto, produz quadro de anemia falciforme no homozigoto (ZAGO et al., 1983).

A doença falciforme afeta milhões de pessoas no mundo e ocorre em 1 a cada 500 nascimentos afro-americanos e em 1 a cada 4000 nascimentos hispano-americanos (GONÇALVES et al., 2003). Na Venezuela, estudo epidemiológico mostrou frequência variável de zero nos índios venezuelanos a 5% nos mestiços e afro-americanos; em algumas regiões, como na costa norte e central, a frequência pode chegar a 12% (MORENO et al., 2002).

Zago, Figueiredo e Ogo (1992), afirmavam que o Brasil tinha a maior população não branca da América do Sul, estimada em 45% dos 182 milhões de habitantes (IBGE, 2004), dos quais 1 a 6% eram portadores do gene da HbS (ZAGO, FIGUEIREDO e OGO, 1992).

Gonçalves et al., em suas pesquisas publicadas em 2003, em Salvador, na Bahia, constataram que o traço falcêmico foi encontrado numa frequência de 6,9 a 15,4% nos indivíduos descendentes de africanos. Conforme dados históricos, naquele Estado houve grande afluxo de escravos provenientes do Oeste e Centro da África, trazendo expressiva heterogeneidade étnica, cultural e social, além de diferenças genéticas na doença falciforme (GONÇALVES et al., 2003).

Apesar da frequência da anemia falciforme ser maior em pessoas da raça negra, estudos populacionais têm demonstrado a presença de hemoglobina S em pessoas descendentes de populações do Mediterrâneo (gregos e italianos), Caribe, América Central e do Sul, Arábia e Índia (SALOOJEE, 1999). No Brasil, que apresenta população com diferentes origens raciais e diversificado grau de miscigenação, a doença tornou-se problema de saúde pública (PAIVA E SILVA, RAMALHO e CASSORLA, 1993). Devido à configuração demográfica e racial do país, a informação genética sobre o portador sadio e a doença vem sendo priorizada pelo governo

federal na última década, quando foram instituídos programas voltados ao combate da morbimortalidade decorrente da anemia falciforme (DINIZ e GUEDES, 2003).

Segundo estimativa da Organização Mundial de Saúde, 5% da população mundial é portadora do gene para hemoglobinopatias, e a cada ano nascem aproximadamente 300.000 com hemoglobinopatia. Desses, 200.000 casos de anemia falciforme ocorrem na África (WHO, 2005).

No Brasil, estima-se que existam mais de 10.000 portadores da anemia falciforme, e que ocorra o nascimento de 3.500 casos novos anuais de doenças falciformes (M.S., 2007 – informação via E-mail). Conforme a Portaria n.º 951/1996 do Ministério da Saúde, vinte por cento delas não irão completar cinco anos de idade devido a complicações relacionadas diretamente à doença e o restante apresentará redução acentuada do rendimento escolar (DUCATTI et al., 2001) devido à morbidade por ela causada.

A mortalidade até os 5 anos de idade é de cerca de 25 a 30%, devido a infecções fatais, seqüestro esplênico ou crises aplásticas (DI NUZZIO e FONSECA, 2004).

Na Resolução da Diretoria Colegiada n.º 1376 do Ministério da Saúde de 1993, havia a sugestão para a detecção da hemoglobina S e de outras hemoglobinas anormais nos doadores de sangue, recomendando-se o uso com ressalvas do sangue dos doadores que apresentassem hemoglobinas anormais.

Em 1997, Paiva e Silva e Ramalho, da Unicamp, estudaram uma população de doadores de sangue para detectar os heterozigotos assintomáticos, a fim de promover o aconselhamento genético a esses indivíduos. Em 1999, Ramalho et al., analisaram a viabilidade e eficiência de três programas de triagem de hemoglobinopatias envolvendo doadores de sangue, gestantes e escolares do ensino fundamental e médio. O método utilizado foi a eletroforese de hemoglobinas e exames complementares. Em um total de 13.670 indivíduos que participaram da pesquisa, foram encontrados 14 casos de doenças hematológicas (9 SS, 3 SC, 1 CC, 1 β -talassemia major), 630 heterozigotos para hemoglobina S, C e β -talassemia. A frequência média de distúrbios da hemoglobina foi de 4,7%, considerando-se os homozigotos e

os heterozigotos. Os autores defendiam a idéia da triagem populacional para iniciar o tratamento precocemente, e também o aconselhamento genético, com a finalidade educacional e não eugênica (RAMALHO et al., 1999). Paiva e Silva, Ramalho e Cassorla (1993), informavam que os dados da literatura internacional mostravam que o diagnóstico precoce, sobretudo ao nascimento, e a terapia adequada representavam papel fundamental na redução da morbidade e mortalidade dessas crianças, melhorando drasticamente a taxa de sobrevivência e sua qualidade de vida.

A triagem populacional de heterozigotos assintomáticos para aconselhamento genético é procedimento controverso, pois envolve o risco de rotulação, discriminação, estigmatização, perda de auto-estima e invasão de privacidade (PAIVA E SILVA e RAMALHO, 1997). Embora o Comitê de Prevenção e Controle das Hemoglobinopatias Hereditárias da Organização Mundial da Saúde tenha insistido na implantação dos programas na América Latina, especialmente no Brasil, esses autores eram bastante incisivos quanto à maneira adequada de implantação destes programas, para não incentivar a estigmatização e o preconceito.

A inclusão da pesquisa de hemoglobinopatias no Programa Nacional de Triagem Neonatal – "Teste do Pezinho" – demonstrou ser um passo importante na diminuição das taxas de mortalidade por anemia falciforme nos primeiros dois anos de vida, pois permite a identificação precoce desses indivíduos e a conseqüente introdução de profilaxia adequada para as infecções, com antibióticos e seguimento ambulatorial regular (DI NUZZIO e FONSECA, 2004).

A triagem neonatal teve início na década de 60, nos Estados Unidos, com a coleta de sangue seco em papel filtro. Essa técnica foi desenvolvida por Robert Guthrie. No Brasil, a primeira tentativa ocorreu em 1976, na cidade de São Paulo, pela Associação de Pais e Amigos dos Excepcionais (APAE) que em uma iniciativa pioneira na América Latina, realizava somente o diagnóstico da fenilcetonúria, e a partir de 1980 incorporou-se também a pesquisa do hipotireoidismo congênito.

Em 13 de julho de 1990, a Lei Federal n.º 8.069, conhecida como o Estatuto dos Direitos da Criança e do Adolescente, que substituiu o antigo Código de Menores,

tornou obrigatória a realização desses dois testes em todo o território federal. Foi incorporada ao SUS, através da Portaria n.º 22 de 15 de janeiro de 1992 e a legislação federal foi complementada, determinando e definindo a fenilcetonúria e o hipotireoidismo congênito como as patologias a serem triadas.

No Paraná, a Lei Estadual n.º 867/1987 tornou obrigatória a realização da pesquisa do "Teste do Pezinho" que consistia somente na pesquisa da fenilcetonúria, em todos os recém-nascidos no Estado.

O órgão responsável pela triagem neonatal no Estado do Paraná é a Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional através do seu Centro de Pesquisas, que iniciou um programa gradativo para o Estado. Em 2000, realizou uma pesquisa-piloto das hemoglobinopatias, com interesse na implantação estadual.

A FEPE é uma instituição filantrópica que tem por missão "realizar pesquisa, prevenção e diagnóstico nas áreas de educação, saúde e inclusão da pessoa com deficiência mental".

1.1 JUSTIFICATIVA

O Brasil é um país formado por várias etnias. Cada uma delas contribuiu com características próprias em vários aspectos, dentre eles o da saúde. A população do mediterrâneo, por exemplo, trouxe a talassemia para o nosso país.

Por outro lado, os indivíduos provenientes principalmente da África, na condição de escravos, trouxeram as hemoglobinopatias como as doenças falciformes. Historicamente, o tráfico negreiro teve início em 1576 com o desembarque de cerca de 40 mil africanos na condição de escravos nos portos brasileiros, a maior parte deles destinada ao trabalho nos canaviais e engenhos de cana-de-açúcar (MARQUESE, 2006). Como a sua entrada ocorreu de modo desordenado devido à política escravagista nos séculos XVI a XIX, houve também uma distribuição não controlada dos portadores dos genes dessas hemoglobinopatias. As regiões Norte e Nordeste do país receberam o maior afluxo de escravos e, conseqüentemente, o maior número de seus descendentes.

A região Sul, por outro lado, teve um menor contingente deles e maior imigração de europeus (IANNI, 1988; TRENTA, 1989).

A prevalência das doenças falciformes, particularmente da anemia falciforme, reflete a influência da etnia africana nas diversas regiões do país.

Na Conferência do Instituto Nacional de Saúde do Canadá, sobre a triagem neonatal para doenças falciformes e outras hemoglobinopatias ocorrida em abril de 1987, declarava-se que nos 20 anos anteriores a 1987, já se sabia que as crianças portadoras de anemia falciforme possuíam susceptibilidade aumentada a infecções bacterianas graves, particularmente devida ao *Streptococcus pneumoniae*. O risco de infecções é maior nos primeiros 3 anos de vida e pode ser a primeira manifestação clínica da doença aos 4 meses de idade; em 30%, os casos são fatais. Além das infecções, as crises de seqüestração esplênica aguda também contribuem para a mortalidade na infância. Os programas de triagem neonatal auxiliam na redução da morbidade e mortalidade infantil, devido à imediata inclusão da criança no acompanhamento clínico e instituição da terapia profilática com penicilina (WETHERS et al., 1987). Esses programas melhoram a sobrevida do paciente, e o aconselhamento genético aos casais portadores do gene da hemoglobina S propõe a educação familiar.

A determinação da prevalência da anemia falciforme no Estado do Paraná e outros novos dados que serão conhecidos no desenvolvimento dessa pesquisa, permitirão mapear as regiões de maior concentração da doença falciforme, do gene da HbS e do heterozigoto portador sadio. Assim, estudos e ações epidemiológicas para a melhoria na Saúde Pública poderão ser realizadas a nível municipal, estadual e também federal.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Conhecer a prevalência dos homozigotos – anemia falciforme – e dos heterozigotos para HbS, no Estado do Paraná, através das amostras de sangue dos recém-nascidos coletadas para o "Teste do Pezinho".

1.2.2 Objetivos Específicos

- Selecionar, dentre as amostras coletadas no período de 2002 a 2004, todas que apresentaram o genótipo FS pela triagem neonatal.
- Comparar o genótipo obtido pela triagem neonatal com o genótipo obtido após os exames confirmatórios.
- Determinar a prevalência da associação S β -talassemia.
- Comparar a frequência do portador sadio da HbS em relação à cor da pele.
- Identificar as amostras selecionadas SS, S β -talassemia e FAS quanto às suas distribuições geográficas nas vinte e duas Regionais de Saúde do Estado do Paraná.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORIGEM HISTÓRICA DA HBS NO BRASIL

A HbS foi introduzida no continente americano principalmente devido ao maciço comércio de escravos provenientes da África, que aconteceu entre os séculos XVI a XIX (ZAGO, FIGUEIREDO e OGO, 1992).

O Estado da Bahia, situado na região Nordeste do país, recebeu um dos maiores afluxos de escravos africanos, proveniente da região do Congo e Angola. A Bahia passou por 4 períodos oficiais de tráfico negreiro: o ciclo Guiné, durante o século XVI, o ciclo Angola e Congo, durante o século XVII, o ciclo da costa do Marfim durante o século XVIII e o ciclo da Baía de Benin entre 1770 e 1850 (GONÇALVES et al., 2003).

O Rio Grande do Norte, também situado na Região Nordeste do país, tinha na sua composição étnica a miscigenação do branco, proveniente principalmente de Portugal; do negro, proveniente da costa Oeste da África, e dos índios das tribos Poti, Tapuia e Cariri, conforme Medeiros (1973)¹ e Cascudo (1980)² apud De Araujo et al. (2004).

O Estado do Paraná, nos séculos XVII, XVIII e XIX, foi uma sociedade heterogênea, composta por índios, europeus e africanos, e marcada também pela escravidão (BALHANA, 1977). Na composição da sua população, estavam presentes o índio, o branco e o negro, bem como toda a variada gama de mestiços, decorrentes da miscigenação característica do quadro demográfico de grande parte das regiões brasileiras (BALHANA, 1977). No segundo quartil do século XVIII, a pecuária se expandia como atividade fundamental, a mineração decaía progressivamente; os negros e mulatos se tornavam

¹MEDEIROS, T. A. **Aspectos geopolíticos e antropológicos da história do Rio Grande do Norte**. Natal: Imprensa Universitária, 1973.

²CASCUDO, L. C. **História da cidade de Natal**. 2.ed. Rio de Janeiro, Civilização Brasileira, 1980.

numerosos e relativamente importantes. No litoral, cuja vila principal era Paranaguá, os "pretos, pardos e mulatos correspondiam a cerca de 27% da população total. Na região do planalto, cuja vila principal era Curitiba, eles formavam 34% do total dos habitantes" (MARTINS, 1941³ apud IANNI, 1988).

Sob o ponto de vista de Balhana (1977), a participação econômico-social dos escravos na formação do efetivo populacional paranaense foi bastante significativa e persistiu durante um longo tempo, imprimindo-lhe características que o identificam com aquelas do modelo clássico da população brasileira (BALHANA, 1977).

Entretanto, para Probst et al. (2000), o estudo sobre o polimorfismo HLA, mostrou que foi baixa a contribuição do descendente africano no Estado do Paraná, pois a vinda desses indivíduos, ocorrida nos séculos XVII e XVIII foi provocada pelo processo escravagista. Naquele momento vieram poucos indivíduos, pois o Paraná era um estado economicamente pobre. Entretanto, os autores salientaram a importância da migração interna que aconteceu em um passado recente, de indivíduos afro-descendentes que saíram das regiões Nordeste e Oeste do país rumo ao Estado do Paraná, intensificando a importância do componente africano nesse Estado (PROBST et al., 2000).

Marcondes e De Abreu, 1991, no livro *Escravidão e Trabalho*, descrevendo a sociedade de Guarapuava do século XVIII, mostraram, através do livro de registro de batizados da igreja local, que muitos eram filhos de pais desconhecidos. Isto também comprovava "a forte miscigenação, pois 64,5% das crianças são de cor parda, 1,19% são mulatas e para 0,89% não consta a cor" (MARCONDES e DE ABREU, 1991). Essa miscigenação deu origem ao processo de branqueamento e ascensão social do negro, pré-requisito para ser aceito na sociedade dos brancos e ocupar tarefas intermediárias como assalariado (MARCONDES e DE ABREU, 1991).

³MARTINS, R. **Quantos somos e quem somos**. Curitiba: Empresa Gráfica Paranaense, 1941. p.85-86.

A partir do século XIX a imigração foi intensificada com a vinda predominante de italianos, alemães, poloneses, ucranianos e japoneses. Em menor número vieram os holandeses, russos, austríacos, ingleses, libaneses franceses e espanhóis (PROBST et al., 2000). A saída desses migrantes de seus países de origem aconteceu pelo excesso de população, pela pobreza e também pela falta de alimentação. O Brasil representava a esperança na reconstrução de suas vidas.

A vinda dos imigrantes europeus, particularmente dos italianos, ocorreu por dois interesses principais. O primeiro era o da oligarquia do café: num primeiro momento, para suplementar a mão-de-obra escrava (a partir de 1850, quando se interrompeu o tráfico de escravos) e depois para substituí-la (a partir de 1888, quando da abolição da escravatura). O segundo interesse manifesto na imigração era a colonização. Como a população nativa era em pequeno número, a tarefa de ocupação dos espaços foi confiada aos imigrantes por iniciativa dos governos centrais e provinciais, contrapondo-se aos interesses dos empresários agrícolas ligados ao café. Para esta colonização, os imigrantes teriam que ocupar as províncias do sul do país, onde havia terras a desbastar e onde o clima era mais adequado aos europeus (BRAIDO, 1978).

Quanto à procedência, a pesquisa realizada por Balhana (1977), mostrou que a maioria dos italianos que vieram ao Brasil provinham do norte da Itália, predominantemente da região do Vêneto. No Paraná, mais de 90% dos imigrantes italianos foram oriundos daquela região (BALHANA, 1977).

2.2 CLASSIFICAÇÃO RACIAL

Segundo dados do IBGE de 2003, um método de identificação racial é um procedimento estabelecido para o enquadramento dos indivíduos em grupos definidos pelas categorias de uma classificação, sejam estas manifestas ou latentes. Existem basicamente três métodos de identificação racial. O primeiro é a auto-atribuição de pertença, no qual o próprio sujeito da classificação escolhe o grupo do qual se

considera. O segundo é a heteroatribuição de pertença, no qual outra pessoa define o grupo do sujeito. O terceiro método é a identificação de grandes grupos populacionais dos quais provieram os ascendentes próximos por meio de técnicas biológicas, como a análise do DNA (OSÓRIO, 2003).

Com os progressos da biologia e da genética, tornou-se possível estabelecer, a partir da análise do DNA, quais seriam os grandes grupos "raciais" a que teriam pertencido os ancestrais de uma pessoa (OSÓRIO, 2003).

O confronto dos resultados censitários do IBGE de 1991 e 2000 mostrou que, em todo o país, aumentou a proporção de pessoas que se declararam de cor preta (de 5,0% em 1991 para 6,2% em 2000) e diminuiu a proporção de pardos (de 42,6% em 1991 para 39,1% em 2000), o que pode ser um indicativo de mudança nos padrões de identificação e de autoclassificação do brasileiro (IBGE, 2002).

Na população brasileira, os genes responsáveis pelo aparecimento das hemoglobinas S e C foram introduzidos através de escravos de origem africana, enquanto o gene responsável pela talassemia foi introduzido por colonizadores e migrantes de origem mediterrânea. Pelo alto grau de miscigenação entre eles e as populações nativas, atualmente não se pode considerar esses genes restritos a uma determinada raça, sendo observados tanto em negróides quanto em caucasóides (MOREIRA et al., 1989).

Pelo Censo de 2000, o Paraná possuía uma população de 7.387.842 indivíduos caucasóides e 2.017.481 indivíduos classificados como negros (pretos e pardos), perfazendo um total de 21,09% da população total (I Seminário Nacional de Saúde da População Negra, 2004). Em dados mais atualizados, o Datasus informa que a população do Estado do Paraná em 2004 era de 10.015.425 habitantes, sendo, portanto 7.903.172 classificados como caucasóides e 2.112.253 classificados como negros (pretos e pardos) (DATASUS, 2006).

2.3 HEMOGLOBINA NORMAL

A molécula de hemoglobina, que é o pigmento que se encontra dentro do glóbulo vermelho, é uma proteína globular composta por quatro globinas associadas a um grupamento heme, complexo formado por um átomo de ferro em uma estrutura porfirínica. As subunidades das hemoglobinas são codificadas por um pequeno grupo de genes (α e β) que são expressos seqüencialmente durante o desenvolvimento. Os genes do agrupamento ou "cluster" α estão reunidos no braço curto do cromossoma 16, enquanto os genes do agrupamento β estão agrupados no braço curto do cromossoma 11. Nos estágios embrionários iniciais, o tetrâmero de hemoglobina Gower-1 consiste de 2 cadeias ϵ (agrupamento β) e duas ζ (agrupamento α). Aproximadamente no início da oitava semana de gestação, as cadeias produzidas são gradualmente substituídas pela cadeia α adulta e duas diferentes cadeias fetais designadas $G\gamma$ e $A\gamma$. As cadeias γ diferem somente pela presença de glicina ou alanina na posição 136, respectivamente. Durante o período de transição entre o estágio embrionário e fetal, as hemoglobinas Hb Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) e Hb Portland ($\zeta_2 \gamma_2$) são detectadas. A HbF ($\alpha_2 \gamma_2$) torna-se a hemoglobina predominante ao longo do período fetal restante. Após o nascimento, as cadeias γ são gradualmente substituídas pelas cadeias β e δ . Por volta do 6.º mês após o nascimento, 97 a 98% da hemoglobina é formada pelo tetrâmero $\alpha_2 \beta_2$ (HbA), enquanto a HbA₂ ($\alpha_2 \delta_2$) está presente em aproximadamente 2 a 3%. Pequenas quantidades de HbF também são encontradas no sangue adulto normal (TORRES e BONINI-DOMINGOS, 2005) (tabela 1).

TABELA 1 - ONTOGENIA DAS HEMOGLOBINAS

PERÍODO	TIPO DE HEMOGLOBINA	CONCENTRAÇÃO (%)
Embrionário	Gower-1	20-40
	Portland (ζ 2 γ 2)	5-20
	Gower-2 (α 2 ϵ 2)	10-20
FETAL 3m pós concepção-nascimento	Fetal (α 2 γ 2)	70-90
	A (α 2 β 2)	5-10
	A2 (α 2 δ 2)	traços
Pós-nascimento após 6 meses de idade	A (α 2 β 2)	96-98
	A2 (α 2 δ 2)	2-3,5
	Fetal	0-1,0

FONTE: Adaptado de Naoum (1997)

2.4 HEMOGLOBINA VARIANTE

Os distúrbios das hemoglobinas humanas, chamados de hemoglobinopatias, são de importância fundamental na genética médica, pois são as doenças monogênicas mais comuns no mundo, causando morbidade substancial (THOMPSON e THOMPSON, 2002).

Podem ser separados em três grupos amplos, dependendo se a mutação altera a proteína globina, sua síntese ou a mudança desenvolvimental de globina:

1. variantes estruturais: alteram o polipeptídeo da globina, sem afetar sua taxa de síntese;
2. talassemias: síntese diminuída de uma ou mais cadeias de globina, resultando no desequilíbrio das quantidades relativas das cadeias alfa e beta;
3. persistência hereditária de hemoglobina fetal (PHHF): grupo de condições clinicamente benignas que alteram a mudança perinatal de síntese de γ para β -globina (THOMPSON e THOMPSON, 2002).

As variantes estruturais são divididas em três classes, de acordo com o fenótipo clínico:

1. variantes que causam anemia hemolítica. Nessa classe, em geral a hemoglobina mutante torna instável o tetrâmero da hemoglobina. Porém, os exemplos mais frequentes são a hemoglobina falcêmica (HbS) e

hemoglobina C (HbC), que não são instáveis mas fazem com que a globina mutante adquira estrutura anormalmente rígida;

2. variantes com transporte de oxigênio alterado, devido ao aumento ou diminuição de afinidade pelo mesmo, ou devido à formação de metahemoglobina, uma forma de globina incapaz de oxigenação reversível (THOMPSON e THOMPSON, 2002).
3. variantes decorrentes de mutações na região codificante, que causam talassemia (THOMPSON e THOMPSON, 2002), onde ocorre a redução da síntese de uma ou mais cadeias de globina, alterando as quantidades relativas dessas. A mutação reduz o nível de síntese das cadeias alfa ou beta, e esta redução produz uma distorção na sua proporção. A cadeia que é produzida na taxa normal está em excesso pela ausência de uma cadeia complementar com a qual possa formar um tetrâmero. As cadeias em excesso precipitam-se na célula, lesando a membrana e provocando a destruição prematura da hemácia (TORRES et al., 2005).

Apesar de o estudo das talassemias não ser o objetivo dessa pesquisa, é importante o conhecimento das interações da HbS com o traço talassêmico, considerando a miscigenação que existe no Brasil.

A criança com a síndrome S β -talassemia herda um gene S de um dos progenitores e um gene da β -talassemia de outro (WETHERS, 2000).

A síndrome de Silvestroni-Bianco (FIGUEIREDO, 2003), isto é, a dupla heterozigose envolvendo a HbS e a β -talassemia, foi primeiramente descrita por Ida Bianco e Ezio Silvestroni, em 1946 (BIANCO e SILVESTRONI, 2006). Pode ser subdividida em:

- $S\beta^0$ - onde não há síntese de cadeia β normal e conseqüentemente se observa ausência de HbA com eletroforese semelhante ao homozigoto para HbS com elevação de HbA₂ (ZAGO⁴ apud BRASIL, 2001b).
- $S\beta^+$ - a síntese de HbA está presente, porém em quantidade inferior ao normal isto é, a quantidade de HbS é maior do que a de HbA. Haverá pouca produção de HbA (5 a 20%) e elevação de HbA₂ (ZAGO, 2001).

A PHHF (persistência hereditária de hemoglobina fetal) caracteriza-se pela constância de altas taxas de hemoglobina fetal sem alterações talassêmicas dos eritrócitos. Foi descrita pela primeira vez em uma população africana por Edington e Lehman, em 1955. O gene beta está parcialmente bloqueado para a síntese da globina beta, que é compensada pela síntese contínua de hemoglobina fetal. O efeito protetor da HbF está bem demonstrado em pacientes heterozigotos para HbS e PHHF. Esses indivíduos têm mais de 50% de HbS, mas uma grande quantidade de HbF distribuída homogeneamente nos eritrócitos, e apresentam curso clínico benigno (WILLIAMS et al., 1976).

2.4.1 Célula Falciforme

2.4.1.1 Histórico da célula falciforme

Em 1910, James Herrick observou "hemácias com peculiar formato em foice" no sangue de um estudante negro, que apresentava anemia grave, icterícia e fortes dores nas articulações (NAOUM e NAOUM, 2004; DESAI e DHANANI, 2004).

Emmel, em 1917, descreveu, em membros de uma família, o fenômeno da falcização *in vitro*, o que sugeria ser esse um evento genético e que se manifestava em condições de privação de oxigênio (DESAI e DHANANI, 2004). Em 1922, o termo

⁴ZAGO, Anemia falciforme e doenças falciformes.

anemia falciforme foi utilizado por Manson. Em 1927, Hahn e Gillepsie descobriram que a falcização dos eritrócitos ocorria como consequência da exposição das células vermelhas a uma baixa tensão de oxigênio. Em 1947, Accioly⁵, no Brasil, sugeriu que a falciformação dos eritrócitos ocorria como consequência de uma herança autossômica dominante e, somente em 1949, através dos trabalhos de Neel e Beet, é que se definiu que a doença se manifesta em homozigose, resultado de uma herança recessiva, sendo os heterozigotos portadores assintomáticos (NETO e PITOMBEIRA, 2003). Nesse mesmo ano, Linus Pauling e colaboradores separaram, através da eletroforese, a hemoglobina anormal, que foi denominada de *sickle hemoglobin*, de onde se originou a abreviação de uso corrente na literatura, HbS (NAOUM e NAOUM, 2004).

Em 1956, Ingram estabeleceu a natureza bioquímica dessa doença, através de um processo de eletroforese bidimensional associada à cromatografia – *fingerprint*, onde a molécula de hemoglobina foi fracionada e seus peptídeos estudados. Ficou caracterizado que a anemia falciforme era provocada pela substituição do ácido glutâmico por uma valina na cadeia β da hemoglobina, originando-se o conceito de doença molecular (NETO e PITOMBEIRA, 2003; NAOUM e NAOUM, 2004).

Em 1978, Kan e Dozy descreveram a sequência de bases nitrogenadas do gene da globina beta normal (HbA) e da globina beta S. Em 1980, esses mesmos pesquisadores, por meio das técnicas de biologia molecular, concluíram que havia diferenças na sequência das bases nitrogenadas ao longo do agrupamento de genes da globina beta, dependendo da origem geográfica da HbS. A diferenciação antropológica entre pessoas com HbS é identificada por haplótipos (NAOUM e NAOUM, 2004).

⁵ACCIOLY, J. Anemia falciforme. **Arq. Univ.**, Bahia, n.1, p.169, 1947.

2.4.1.2 Haplótipos da hemoglobina S

A região do cromossoma 11 contém um agrupamento de genes da globina do tipo beta referido como "cluster" da β -globina. Mediante análise das regiões polimórficas do grupamento de genes da globina beta, com enzimas capazes de quebrar ligações entre bases nitrogenadas específicas (enzimas ou endonucleases de restrição), concluiu-se que o segmento cromossômico entre os genes ϵ , γ , δ e β^S , pode conter diferentes seqüências de bases nitrogenadas ou haplótipos, que são específicas para determinadas populações ou grupos étnicos (NAOUM e NAOUM, 2004). Em outras palavras, os haplótipos são os numerosos sítios polimórficos de DNA ao longo de um complexo gênico em diferentes combinações desses sítios, no mesmo cromossoma.

Os haplótipos do grupamento da β -globina são nomeados conforme regiões geográficas específicas da África e Oriente Médio, onde eles predominam (ASHLEY-KOCH, YANG e OLNEY, 2000). Portanto, podem ser usados como marcadores para análise genética, que permitem a identificação de segmentos cromossômicos específicos das populações (MIGUEL et al., 2002).

O gene da hemoglobina S está associado a pelo menos 3 haplótipos que representam mutações independentes. O haplótipo SENEGAL está associado com a forma mais benigna da doença, seguido pelo haplótipo BENIN, que se encontra na região oeste central da África. O haplótipo BANTU, encontrado na África Central, desenvolve a forma mais severa da doença (PAGNIER et al., 1984; ASHLEY-KOCH, YANG e OLNEY, 2000). Um outro haplótipo asiático, o ÁRABE-INDIANO (Argélia) é encontrado na província da Arábia-Saudita e Norte da África (PAGNIER et al., 1984).

2.4.1.3 Anemia falciforme – etiologia da doença

A anemia falciforme é um distúrbio genético de caráter autossômico recessivo, que se caracteriza pela homozigose da hemoglobina S. É uma doença crônica que cursa, entre outras anormalidades, com o déficit precoce de peso e estatura, atraso da maturação sexual e prejuízo no desempenho escolar (MIGUEL et al., 2002).

O gene da subunidade β , que se localiza no braço curto do cromossoma 11, sofre uma mutação de mudança de sentido, causando a substituição do aminoácido ácido glutâmico (GAG) por uma valina (GTG), na 6.^a posição da cadeia beta da globina, cuja notação química é ($\alpha_2^A\beta_2^S$) (THOMPSON e THOMPSON, 2002), isto é, uma variação da hemoglobina normal HbA ($\alpha_2^A\beta_2^A$). Por ser uma anomalia da cadeia beta da globina, as características clínicas desta doença só passam a ser percebidas após a estabilização da produção das globinas, que ocorre em torno do 6.^o mês de vida, quando a síntese da globina gama (fase fetal) é inibida e a síntese da globina beta se faz em plenitude (PEARSON, 1989).

Com o passar do tempo, essas crianças mostram-se mais fracas, com retardo de crescimento e desenvolvimento e com maior susceptibilidade a infecções bacterianas e virais. Alternam-se então períodos de remissão relativa com períodos de exacerbação clínica, caracterizados por crises hemolíticas, aplásticas, vaso-oclusivas e de seqüestramento (RAMALHO, 1986). Está associada à alta morbidade e mortalidade na infância devido à sepse bacteriana, crise de seqüestração esplênica e síndrome torácica aguda (SHAFFER et al., 1996). Em 1986, Gaston et al., em estudo clínico randomizado demonstraram que o uso profilático de penicilina reduzia a morbidade e mortalidade de infecções bacterianas em crianças abaixo de 5 anos, sinalizando que o diagnóstico precoce é fator importante para o tratamento profilático.

2.4.1.4 Mecanismo da falcização

A presença de grande concentração da hemoglobina (32 a 34g/dl) na hemácia exige que a proteína seja extremamente solúvel. Quando a hemoglobina S é desoxigenada, a troca do ácido glutâmico por uma valina resulta em uma interação hidrofóbica com outra molécula de hemoglobina, desencadeando a formação de grandes polímeros. A polimerização da hemoglobina S desoxigenada é o evento primeiro na patogênese molecular da doença falciforme, que resulta na distorção da forma da hemácia e na acentuada diminuição da sua deformabilidade (BUNN, 1997).

Estas células rígidas são responsáveis pelos fenômenos vaso-oclusivos que são a marca da doença.

Em nível molecular, o processo da falcização ocorre a partir do momento em que a oxi-hemoglobina S perde o oxigênio e se torna deoxi-HbS. Esta promove a formação de pontes de hidrogênio entre os aminoácidos valina da posição 1 da β^S -globina e a valina mutante que substituiu o ácido glutâmico da posição 6 da mesma globina. A formação dessas pontes de hidrogênio modificam a estrutura espacial da molécula da HbS e promove contatos intermoleculares com outros aminoácidos da globina β^S que formam o tetrâmero. Os principais aminoácidos envolvidos são a fenilalanina da posição 85 e a leucina da posição 88. Em consequência, formam-se agregados desses filamentos que se polimerizam e alteram a estrutura globular das moléculas de HbS, modificando também a morfologia discóide do eritrócito para formas bizarras, das quais a mais conhecida é o afoiçamento.

FIGURA 1 - HEMÁCIA FALCIZADA



FONTE: <www.defiers.com/sc.jpg>. Acesso em: 10 out. 2005

Sob tais condições, a célula sobrevive somente 20 dias na circulação, ao invés dos 120 dias normais (NAOUM, 2000).

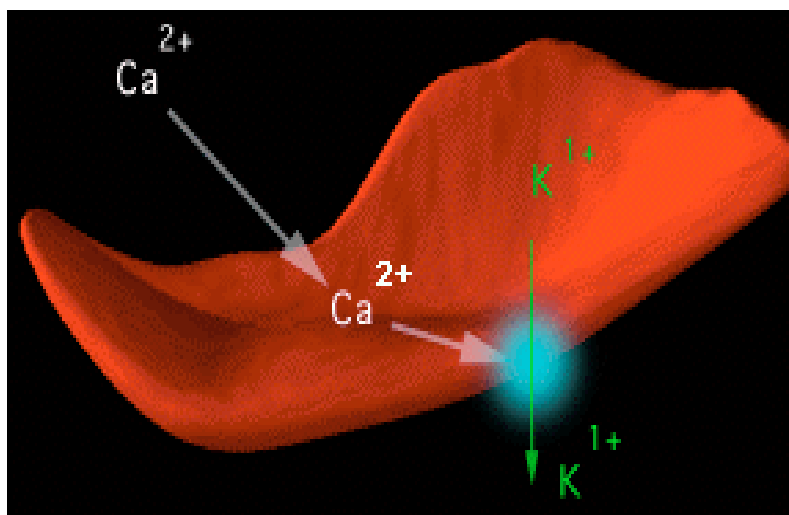
Apesar da concentração média da hemoglobina intracelular e a densidade média das hemácias SS serem próximas às hemácias normais, a distribuição da densidade das hemácias falciformes é extraordinariamente ampla. O pequeno aumento na densidade das hemácias SS é devido ao grande número de reticulócitos com relativa baixa concentração de hemoglobina intracelular. A presença de células muito densas

resulta de danos na membrana da hemácia, induzidas pela polimerização, intensificando a desidratação celular. O fim deste processo é a falcização irreversível, mesmo que a célula esteja bastante oxigenada e sem polímeros (BUNN, 1997).

Os fatores que contribuem para a desidratação das hemácias SS são o KCl-co-transportador e o Ca^{++} ativador da saída de K^+ . Na hemácia normal AA, o co-transportador-KCl só está ativado no reticulócito e é induzido pela hidratação celular e pela acidificação do meio intracelular, este último podendo ocorrer onde a circulação é mais lenta (BUNN, 1997).

As hemácias SS possuem concentração aumentada de cálcio armazenado em vesículas celulares, sendo que a quantidade no citosol da hemácia se encontra equilibrada. Quando a membrana da hemácia se deforma pela polimerização, há um aumento transitório de Ca^{++} no citosol. Este aumento é suficiente para ativar o canal de K^+ , também conhecido como canal de Gardos, que é Ca^{++} dependente, formando um outro meio para a falcização induzida pela perda de K^+ e água, que culmina com a desidratação celular (BRUGNARA, 1995; BUNN, 1997).

FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATIVIDADE DO CANAL DE GARDOS NA HEMÁCIA FALCIFORME



FONTE: Brugnara (1995)

NOTA: As hemácias contêm proteínas do Canal de Gardos em suas membranas. A hemácia falciforme acumula quantidades excessivas de cálcio, que por sua vez ativam o canal de Gardos (círculo azul da ilustração). O Canal de Gardos é uma proteína "bomba" que expelle o K^+ intracelular, quando é ativado pelo cálcio; a hemácia se desidrata, resultando em uma concentração intracelular da Hb aumentada, que vai promover a polimerização da HbS desoxigenada.

2.5 ANEMIA FALCIFORME E SINTOMAS CLÍNICOS

2.5.1 Vasocclusão

O fenômeno da vasocclusão inicia-se e se mantém por interação entre as células falcizadas, células endoteliais e componentes do plasma. Devido a esta associação, há um desequilíbrio entre os vasodilatadores e vasoconstritores, favorecendo a vasoconstrição. A aderência das hemácias falcizadas sobre as células endoteliais diminui o fluxo sangüíneo, de modo que sucessivos processos de polimerização da hemoglobina S, falcização e vasocclusão ocorrem antes que a passagem do sangue através dos microvasos seja completada. A elevação no número de granulócitos é um mau prognóstico na anemia falciforme. Os granulócitos interagem com as células falcizadas e as células endoteliais são estimuladas a liberarem citocinas. As plaquetas ativadas liberam trombospondina, que promove a adesão das células falciformes às células endoteliais. Os reticulócitos que são prematuramente liberados da medula óssea nas doenças hemolíticas apresentam ligantes adicionais que facilitam interações entre as células falciformes e as células endoteliais (STEINBERG, 1999).

2.5.2 Crises Dolorosas

De forma secundária às oclusões intermitentes da microcirculação ocorrem as crises dolorosas, provocando danos nos tecidos e dor. Geralmente são de início agudo, durando em torno de 3 a 5 dias. A dor atinge mais freqüentemente os ossos e articulações, podendo atingir também o tórax, o abdômen e a região dorsal. A dactilite (inflamação em dedo) ou síndrome mão-pé é a primeira manifestação de dor nas crianças; caracteriza-se por dor e edema nas extremidades. Esses episódios de dor geralmente são autolimitados e podem desaparecer espontaneamente, porém devido à possibilidade de condutas equivocadas, seqüelas crônicas ou mesmo risco de vida, merecem atenção especial.

Infecções, febre, hipóxia, desidratação e exposição ao frio, níveis mais elevados de Hb, são fatores que podem desencadear as crises álgicas (GUALANDRO, 2001).

2.5.3 Sequestro Esplênico

O sequestro esplênico, que ocorre principalmente entre os 5 meses e 2 anos de idade, é uma complicação resultante da estase (estagnação) aguda das células falciformes nos sinusóides do baço, que aumenta de volume em 2cm ou mais à palpação, resultando em anemia, reticulocitose e plaquetopenia. Há uma queda súbita de pelo menos 20% do hematócrito basal. Os sintomas manifestados são: palidez muco-cutânea de instalação súbita, acompanhada de distensão e dor abdominal pela esplenomegalia, podendo ocorrer polidipsia. Os episódios variam de intensidade, podendo se resolver espontaneamente ou levar a óbito em horas.

O tratamento deve ser de urgência, pois é uma complicação em geral de caráter fatal. A maior parte da mortalidade decorre do choque volêmico e não da anemia. Por isso, a conduta inicial consiste em reposição de volemia por expansores de volume. A transfusão deve ser em pequenos volumes, o suficiente para estabelecer o equilíbrio hemodinâmico e ao mesmo tempo evitar a hipervolemia (NAOUM e NAOUM, 2004).

2.5.4 Síndrome Torácica Aguda

Dor torácica, tosse, febre, dispnéia, infiltrados pulmonares e declínio no nível basal de hemoglobina são os sintomas que caracterizam a síndrome torácica aguda. Afeta em torno de 40% dos pacientes com anemia falciforme (STEINBERG, 1999). É uma das causas de internação da criança com doença falciforme e freqüentemente responsável pela sua morte. A etiologia da síndrome está relacionada com infecções virais, por micoplasma ou *Chlamydia pneumonia*. As causas não infecciosas incluem o edema pulmonar por hiper-hidratação, embolia gordurosa de medula óssea infartada e a hipoventilação por uso de analgésicos narcóticos administrados para

combater a dor (FABRON JR., 1997). As transfusões ou exosangüíneo transfusões devem ser iniciadas se a pO_2 for menor que 70 mmHg ou houver queda de 10% nos níveis basais da pO_2 do paciente (SAAD, 2001a).

2.5.5 Febre

A febre em pacientes com doença falciforme deve ser rigorosamente avaliada pois existe risco extremamente alto de desenvolvimento de septicemia, principalmente nos primeiros anos de vida. Nos pacientes com anemia falciforme, a asplenia funcional, que dificulta a opsonização das bactérias capsuladas, principalmente *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* tipo B, favorece a ocorrência de infecções fulminantes nesses doentes.

O uso da penicilina profilática reduz acentuadamente o risco da septicemia e meningite pneumocócica, quando iniciada precocemente, idealmente antes dos 4 meses de idade (FABRON JR., 1997).

2.5.6 Acidente Vascular Cerebral

O AVC é uma complicação neurológica que acontece em até 25% dos pacientes com anemia falciforme. Ocorre mais freqüentemente entre os 3 e 10 anos de idade. É recorrente em até 50% destes pacientes nos primeiros 3 anos após o acidente. Transfusões crônicas reduzem em até 90% a recorrência destes episódios (FABRON JR., 1997 e FIGUEIREDO, 2001).

2.5.7 Priapismo

Denomina-se priapismo a ereção dolorosa e persistente do corpo cavernoso do pênis não associado ao desejo sexual (BEGLIUOMINI, 2001). Ocorre em meninos e adultos jovens. Na maioria dos casos é autolimitado e regride espontaneamente dentro de 24 horas. Quando persiste por alguns dias, além do desconforto físico,

pode resultar em impotência (FABRON JR., 1997). Contudo, não existem dados seguros em relação à duração do priapismo e os riscos de impotência (BEGLIUOMINI, 2001). A hidratação oral, banhos quentes e o esvaziamento da bexiga revertem em algumas horas a maioria das crises. Se não houver resolução com essas medidas, cuidados de urgência como hidratação endovenosa, narcóticos para alívio da dor e métodos transfusionais devem ser considerados (FABRON JR., 1997).

2.5.8 Úlcera de Perna

A úlcera de perna inicia-se com poucas alterações locais, passando a escurecimento da pele, necrose e infecção por bactérias (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas* e *Streptococcus*). Geralmente acompanhada de dor, dificulta a limpeza local para remoção mecânica das crostas.

Acomete os pacientes com anemia falciforme, mas ocorre raramente em pacientes com a interação S β -talassemia e em crianças menores de 10 anos. Fatores genéticos, ambientais, sociais e econômicos predispõem à sua formação. A realização de culturas microbiológicas para o controle da infecção e o emprego de antibióticos são medidas necessárias para a remissão das úlceras (FABRON JR., 1997; MANUAL DE DIAGNÓSTICO..., 2001).

2.5.9 Anemia

A anemia é do tipo hemolítico, com icterícia, elevação e predomínio da bilirrubina indireta e aumento de reticulócitos (ZAGO, 2001).

Conforme Fabron Jr. (1997), a maioria dos portadores de doença falciforme apresenta níveis crônicos de hemoglobina entre 6,0 a 11,0g/dl, com anemia compensada. Apesar dos baixos níveis de hemoglobina, os pacientes não apresentam sintomas importantes de anemia, como cansaço, dispnéia e claudicação intermitente. Por isso, a transfusão não é o tratamento mais indicado (ZAGO, 2001). A transfusão está indicada somente quando ocorre a queda aguda no nível basal de hemoglobina, que

pode ser sinal de crise aplástica, de seqüestração esplênica ou de infecção. Na crise aguda de seqüestração esplênica, há o acúmulo repentino de sangue dentro dos sinusóides esplênicos, com acentuado aumento do órgão, declínio na concentração da hemoglobina e elevação dos reticulócitos. É uma complicação grave da doença falciforme, com risco de morte imediata devido à queda brusca e intensa do nível de hemoglobina e da possibilidade de choque hipovolêmico. Ocorre geralmente em crianças menores de 5 anos e em adolescentes $S\beta$ -talassemia, que persistem com esplenomegalia (FABRON JR., 1997).

Os pacientes com HbSS são os mais gravemente afetados, seguidos pelos pacientes $S\beta^0$ -talassemia. Aqueles com HbSC e $S\beta^+$ -talassemia tendem a ter um desenvolvimento mais benigno da doença (GILL et al., 1994⁶ apud ASHLEY-KOCH, YANG e OLNEY, 2000). Os pacientes SS e $S\beta^0$ -talassemia são transfundidos com maior freqüência dos que os pacientes SC ou $S\beta^+$ -talassemia (NAOUM e NAOUM, 2004).

A transfusão pode ser necessária em pacientes com anemia falciforme para repor o volume sangüíneo perdido por hemorragia, seqüestro esplênico ou para aumentar a capacidade de carrear o oxigênio como nas exacerbações da anemia. Em condições crônicas, o paciente suporta níveis de hemoglobina de 5g/dl, necessitando de transfusão somente nos casos de falência cardíaca, dispnéia e disfunção do sistema nervoso central (SAAD, 2001). As hemácias transfundidas devem ser homozigotas AA conforme Resolução do Ministério da Saúde, RDC n.º 153.

As transfusões periódicas podem provocar sensibilização ao paciente, que poderá formar aloanticorpos, dificultando a obtenção de doadores compatíveis em transfusões futuras. É aconselhável, portanto, a transfusão de hemácias provenientes de doadores compatíveis para os principais antígenos eritrocitários dos sistemas sangüíneos Rh, Kell, Kidd e Duffy. As hemácias transfundidas diminuem, por diluição, a fração de células que contêm a HbS, e também diminuem a eritropoese das células

⁶GILL, F. M.; SLEEPER, L. A.; WEINER, S. J. et. al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. The Cooperative Study of Sickle. **Blood**, v.84, n.2, p.643-649, 1994.

falciformes. A outra modalidade de substituição da HbS por HbA é a exsangüíneo-transfusão, indicada para situações agudas com rápida deterioração clínica (NAOUM e NAOUM, 2004).

O procedimento transfusional pode provocar reações imediatas ou tardias, além da sobrecarga de ferro e do risco de transmitir infecções.

A forma de tratamento que se dispõe é o uso de hidroxiauréia e butiratos, que aumentam a produção de hemoglobina fetal e diminuem a proporção da HbS.

O aumento intracelular da HbF dilui a hemoglobina S e inibe a polimerização, possibilitando uma melhor sobrevida (DAVIES e ROBERT-HAREWOOD, 1997).

A HbF tem efeito protetor sobre a HbS. A sua elevação resulta em redução compensatória da HbS ($\alpha_2\beta_2^S$), para manter a concentração intracelular da hemoglobina total. Além disso, os tetrâmeros da HbF ($\alpha_2\gamma_2$) se dissociam em dímeros e podem formar híbridos mistos com os dímeros da HbS ($\alpha^2\beta^S\gamma$). Nem os híbridos mistos nem os tetrâmeros da HbF têm afinidade pelo polímero da deoxi-HbS.

A evidência do benefício clínico da hemoglobina fetal na doença falciforme advém da observação que pacientes portadores de anemia falciforme das regiões da Arábia Saudita e Índia, que comumente apresentam HbF em alta concentração, apresentam manifestações clínicas mais brandas e anemia menos intensa (BUNN, 1997 e NAOUM e NAOUM, 2004). Outra evidência advém do fato de que a criança produz a HbF até a idade de 4 a 6 meses, por isso as manifestações clínicas só irão começar a surgir após a diminuição da HbFetal (DAVIES e ROBERT-HAREWOOD, 1997).

2.6 ATRASO NO DESENVOLVIMENTO

Pela anemia crônica, ocorre um atraso no desenvolvimento somático e sexual dos pacientes com doenças falciformes, com déficit pândero-estatural, que pode ser observado já nos primeiros anos de vida.

Na adolescência, a menarca ocorre mais tardiamente, podendo ser seguida de amenorréia secundária. O surgimento dos caracteres sexuais secundários é

retardado em ambos os sexos. Entretanto, esses pacientes são férteis e podem gerar filhos (ZAGO, 2001).

2.7 PROFILAXIA E TRATAMENTO

O tratamento das doenças falciformes se inicia com o diagnóstico neonatal que, aliado à penicilina profilática, educação e cuidados familiares, representa um dos avanços mais importantes na sua história. Em 1998, todos os indivíduos americanos afetados com as doenças falciformes já eram sistematicamente identificados precocemente pelos programas de triagem neonatal (REED e VICHINSKI, 1998).

O *National Cooperative Study of Sickle Cell Disease* (NSSCD), em estudo prospectivo, demonstrou que a administração de penicilina oral diária poderia evitar até 84% dos episódios sépticos em relação à administração de placebo (REED e VICHINSKI, 1998).

A administração da penicilina profilática deve ser iniciada aos 3 meses de idade para as crianças com doenças falciformes (SS, SC, S β), devendo ser continuada até os 5 anos de idade. O esquema recomendado pelo Ministério da Saúde, no Manual Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes, 2001, é:

- Penicilina V (oral):
 - 125mg VO (2 vezes ao dia) para crianças até 3 anos de idade ou 15kg.
 - 250mg VO (2 vezes ao dia) para crianças de 3 a 6 anos de idade ou com 15 a 25kg.
 - 500mg. VO (2 vezes ao dia) para crianças com mais de 25kg.
- Penicilina benzatina - Intra muscular, a cada 21 dias:
 - 300.000 U para crianças até 10kg.
 - 600.000 U para crianças com 10 a 25kg.
 - 1.200.000 U para crianças com mais de 25kg.

Se a criança for alérgica à penicilina, pode-se administrar 20mg/kg de eritromicina oral, 2 vezes ao dia.

2.7.1 Hidroxiuréia

A hidroxiuréia é uma droga usada para estimular a produção da hemoglobina fetal. É relativamente pouco tóxica e seu efeito colateral mielossupressor é reversível. Pacientes com anemia falciforme que recebem o medicamento em dose suficiente para provocar mielossupressão moderada mostram aumento no número de hemácias contendo hemoglobina F e aumento da sua concentração intracelular (DOVER et al., 1986; CHARACHE et al., 1987). Além disso, há uma redução da hemólise e um discreto aumento na concentração da hemoglobina (BUNN, 1997).

Existe também uma forte correlação entre a contagem de neutrófilos e a frequência de crises dolorosas, explicada em parte porque os neutrófilos dos pacientes SS parecem ter maior capacidade de adesão endotelial (BUNN, 1997; NAOUM e NAOUM, 2004).

Resultados promissores tanto em adultos quanto em crianças foram demonstrados por Steinberg (1999), que enfatizava a necessidade de acompanhamento clínico e laboratorial freqüente, com atenção para a contagem de granulócitos e plaquetas e prevenir contra quedas clinicamente significativas desses elementos.

Kinney et al. (1999) descreveram os resultados de um estudo multicêntrico de fase I/II, do qual participaram 50 crianças com anemia falciforme de quadro clínico grave. A idade variou de 5 a 15 anos. Essas crianças receberam a dose máxima tolerada, calculada para esse estudo, durante um ano. Verificou-se aumento estatisticamente significativo no aumento da concentração de hemoglobina, da hemoglobina corpuscular média (HCM), dos níveis de HbF, porcentagem de células F e diminuição significativa na contagem de reticulócitos, de leucócitos totais, de neutrófilos, plaquetas, bilirrubina total e desidrogenase do ácido láctico (LDH), comparados aos valores normais. Esses resultados foram verificados aos 6 meses de uso do medicamento.

Após 12 meses de tratamento, houve confirmação na diferença significativa dos valores hematológicos e bioquímicos obtidos. A hidroxiuréia aumenta a concentração e a porcentagem de hemácias com HbF. O seu aumento intracelular reduz a hemólise porque inibe a formação do polímero da HbS. O efeito hematológico da hidroxiuréia mostrou ser semelhante na criança e no adulto. Os efeitos adversos mais freqüentes observados nesse estudo foram aqueles relacionados ao efeito mielossupressor. A neutropenia moderada foi o efeito mais observado. Essa citotoxicidade foi transitória e rapidamente desapareceu com a descontinuação no uso do medicamento (KINNEY et al., 1999).

2.7.2 Butiratos

O uso do ácido butírico e de seus análogos, na regulação da produção da HbF, foi iniciado pela observação de que em crianças de mães diabéticas o retardo na mudança de hemoglobina F para A estava associado ao aumento na concentração plasmática do ácido-amino N-butírico. Este metabólito, assim como o butirato de sódio, aumenta a expressão do gene da γ -globina nos progenitores eritróides, de pacientes portadores de doenças falciformes ou portadores de β -talassemia (BUNN, 1997).

Embora essa terapia resulte na elevação da concentração da HbF, essa resposta não se mantém com o tratamento prolongado. Além disso, são necessárias longas infusões intravenosas por vários dias para se obter o efeito desejado. Em relação aos compostos ministrados por via oral, é preciso ingerir muitos comprimidos a cada dia, dificultando a adesão ao tratamento (REED e VICHINKY, 1998; NAOUM e NAOUM, 2004).

2.8 TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

Com o advento dos transplantes, é possível a cura total da doença. O primeiro transplante de medula óssea na anemia falciforme foi realizado em uma

menina de 8 anos na qual a indicação primária foi a leucemia mielóide aguda (JOHNSON, LOOK e GOKERMAN, 1984).

Em um estudo multicêntrico publicado em 2001 por Walters et al., 55 crianças portadoras de anemia falciforme foram selecionadas para o transplante alogênico de medula óssea em 27 centros de transplantes europeus e norte-americanos. Sobreviveram 50 crianças, curadas da anemia falciforme.

Na Europa e nos Estados Unidos, conforme Vermylen (2003), os principais critérios para que um paciente portador de doença falciforme possa ser incluído na lista para transplante de medula óssea são:

1. A criança deve ser portadora de anemia falciforme, doença SC ou HbS β^0 -talassemia;
2. A criança deve ter menos de 16 anos e o doador deve ser HLA-relacionado;
3. Deve apresentar, dentre vários outros, pelo menos um dos seguintes sinais ou sintomas:
 - acidente vascular cerebral ou um evento do sistema nervoso central com duração maior do que 24 horas;
 - síndrome torácica aguda;
 - episódios recorrentes de dores graves;
 - nefropatia falciforme, isto é filtração glomerular menor que 30% do valor normal esperado;
 - retinopatia bilateral proliferativa e com prejuízo visual;
 - aloimunização eritrocitária após por longo período de terapia transfusional (VERMYLEN, 2003).

2.9 PORTADOR SADIO DA HbS - DOAÇÃO DE SANGUE

A doação de sangue por brasileiros portadores do traço falciforme começou a ser discutida na década de 70. Baseado na contra-indicação formal da transfusão dessas hemácias por importantes autores americanos como Mollison (1972), Oski e

Naiman (1972), Ramalho (1976) sugeriu que a investigação desta hemoglobina fosse realizada pelos serviços de hemoterapia nacionais. Em 1997, já era de conhecimento que as hemácias heterozigotas não deveriam ser usadas em pacientes com anemia falciforme em crise de falcização, em transfusões de substituição total em recém-nascidos, sobretudo prematuros e em indivíduos em hipóxia intensa (PAIVA E SILVA e RAMALHO, 1997).

O Ministério da Saúde, através da RDC n.º 1376 de 19 de novembro de 1993, que regulamentava as Normas Técnicas em Hemoterapia, alertava para o uso de concentrado de hemácias de doadores heterozigotos para hemoglobina S.

"Item C -3.5. Em pacientes com hemoglobinopatias, o sangue e/ou componentes utilizados devem ser previamente triados para hemoglobinopatias." (BRASIL, 1993).

Assim, na Resolução da Diretoria Colegiada – RDC - n.º 343 de 13 de dezembro de 2002, foi realizada uma importante modificação a respeito da HbS, no item E.3- Detecção de hemoglobinas anormais:

É recomendada a detecção de hemoglobina S e de outras hemoglobinas anormais nos **doadores de sangue** (*grifo da autora*). Os componentes eritrocitários de doadores com pesquisa de hemoglobina S positiva devem conter esta informação no seu rótulo, mas não precisam ser descartados. É recomendado também que não sejam utilizados em pacientes com hemoglobinopatias, em pacientes com acidose grave, ou em recém-nascidos e nem para a transfusão intra-uterina (BRASIL, 2002, p.13).

Para cumprir esta normativa, os serviços de hemoterapia iniciaram a pesquisa da HbS em todos os doadores. A Resolução da Diretoria Colegiada – RDC, do Ministério da Saúde n.º 153 de 14 de junho de 2004, que substituiu a RDC n.º 343, reitera a importância do uso de concentrado de hemácias S negativas para pacientes com acidose grave, recém-nascidos ou transfusões intra-uterinas (BRASIL, 2004).

2.10 DETECÇÃO PRECOCE DA ANEMIA FALCIFORME NO RECÉM-NASCIDO

As doenças falciformes são doenças genéticas que afetam uma parcela significativa da população brasileira, considerando o grande número de indivíduos da raça negra e seus descendentes.

Medidas terapêuticas foram introduzidas pelo Ministério da Saúde em apoio ao paciente já sintomático. Em 1996, a Portaria n.º 951/MS criou o "Programa de Anemia Falciforme" (BRASIL, 1996). Em 1998, a Coordenação de Sangue e Hemoderivados (COSAH), através do Sub-Comitê de Anemia Falciforme criou o "Manual do Paciente com Doença Falciforme" (BRASIL, 1998).

Entretanto, não existia uma política orientada para a detecção precoce e tratamento preventivo do paciente falcêmico. De Sá e Freire, no Jornal *A Folha de São Paulo* de 19 de janeiro de 1997, sob o título "Saúde Pública ignora doença hereditária mais comum no Brasil", criticava o serviço de saúde brasileiro, pois o "Teste do Pezinho", obrigatório no Brasil contemplava uma doença - fenilcetonúria, que é menos prevalente do que a anemia falciforme. Os autores relatavam que não existia uma política pública para o aconselhamento genético de casais, tratamento e diagnóstico da doença. Sugeriam que isso ocorria devido à discriminação racial e à condição sócio-econômica dos pacientes, na maioria da raça negra.

Um exame de sangue detecta a doença até em recém-nascidos. Se o problema é percebido desde cedo, a pessoa com doença falciforme pode tomar vacinas e remédios que tornam sua vida quase totalmente normal". (DE SÁ e FREITAS, 1997).

Naquele momento já havia a preocupação em realizar a prevenção e não somente o tratamento.

A implementação de programas populacionais de pesquisa de hemoglobinopatias na América Latina já havia sido recomendada pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1983), pela *Third World Academy of Science* (TWAS, 1986), e pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 1987). A OMS, em 1993, novamente recomendou a implantação de programas comunitários de pesquisa de hemoglobinopatias

na América Latina, especialmente no Brasil, conforme citado por Penchaszadeh (1993)⁷ apud Ramalho e Paiva e Silva (2000).

A luta da comunidade científica e das comunidades afro-descendentes finalmente conseguiu resultados em 2001, quando o Ministério da Saúde, na gestão do ministro José Serra, através da Portaria n.º 822/MS, de 6 de junho, instituiu no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) o Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) (BRASIL, 2001a). Segundo essa portaria, devem ser realizadas triagens para a detecção de casos suspeitos, confirmação diagnóstica, tratamento, orientação genética e acompanhamento dos casos identificados para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, hemoglobinopatias, com ênfase na anemia falciforme, e fibrose cística.

No Estado do Paraná a partir de 1994, já estava incorporada, por ação voluntária da FEPE, a pesquisa para a deficiência da biotinidase.

Dados atualizados da FEPE, de 2006, mostram que a prevalência da fenilcetonúria (PKU) é de 2,5: 100.000 RN vivos; hipotireoidismo congênito (TSH) 24: 100.000 RN vivos, deficiência de biotinidase (BIO) 3,4: 100.000 RN vivos, fibrose cística (IRT) 5,4:100.000 RN vivos.

2.10.1 Programas de Triagem Neonatal

No início dos anos 60, nos Estados Unidos, o pediatra Robert Guthrie desenvolveu uma técnica simples para a detecção da fenilcetonúria, e um mecanismo para a coleta e transporte de amostras, dando início à triagem dessa doença em grande número de recém-natos e abrindo caminhos para a triagem genética em larga escala pelo seu custo efetivo (THERRELL, 2001). Em 1962, o estado de Massachusetts demonstrou a viabilidade do programa de triagem neonatal em massa, com o primeiro programa de triagem neonatal organizado por Robert Guthrie e Robert MacCready.

⁷PENCHASZADEH, V. **Genetics services for hemoglobinopathies in Latin America.** Joint WHO/Tif Meeting on prevention & control of hemoglobinopathies. Nicosia: WHO, 1993.

É internacionalmente reconhecido como um programa de saúde pública capaz de intervir no tempo adequado para a redução significativa da morbidade, mortalidade e incapacitações provocadas pelas doenças pesquisadas (LLOYD-PURYEAR e FORSMAN, 2002).

Rastreamento ou triagem é a identificação de uma doença ou fator de risco não conhecido por meio da história clínica, exame físico ou procedimento laboratorial usual (por exemplo, determinação de fenilalanina sérica) ou outro procedimento que possa ser aplicado rapidamente. Essa triagem não deve ser confundida com os testes solicitados para pessoas afetadas ou portadoras, identificadas devido a um histórico familiar. Seu objetivo é examinar todos os membros de uma determinada população, independente de sua origem étnica ou do seu histórico familiar. Os testes de rastreamento separam pessoas que aparentemente estão bem, mas que apresentam um fator de risco ou uma doença, daquelas que não as apresentam. Constituem atividade de saúde pública importante, que se tornará cada vez mais eficiente à medida que outros e melhores testes estiverem disponíveis para a identificação das doenças genéticas. São parte de muitas atividades de prevenção primária e de todas as de prevenção secundária. Um teste de rastreamento não pretende ser diagnóstico (FLETCHER, FLETCHER e WAGNER, 1996).

A triagem neonatal deve ser complementada pela confirmação diagnóstica posterior (RAMALHO, MAGNA e PAIVA E SILVA, 2002) e a realização de aconselhamento genético aos pais para informá-los sobre a possibilidade de virem a ter outros filhos afetados, orientá-los sobre os sinais e sintomas precoces das complicações, bem como sobre a identificação de outros portadores na família (SIQUEIRA et al., 2002).

A triagem neonatal refere-se a testes bioquímicos para detecção de distúrbios herdados, geralmente de origem metabólica, cujas manifestações são tratáveis por dietas ou medicamentos. É um sistema composto por seis etapas: triagem, diagnóstico, seguimento, gerenciamento, avaliação e educação, sendo que esta permeia entre as demais e estabelece o mecanismo que vai reforçar os outros componentes desse sistema (THERRELL, 2001).

Para que uma doença genética seja inserida na triagem populacional, a OMS recomenda os seguintes critérios de escolha:

- haver disponibilidade de tratamento;
- o início do tratamento deve ser precoce, antes que os sintomas se manifestem, reduzindo ou eliminando a gravidade da doença;
- a observação e o exame físico rotineiro não revelam o distúrbio no neonato, sendo necessária a realização de um teste para a sua detecção;
- o teste laboratorial disponível deve ser rápido e econômico e deve ser altamente sensível (sem falso-negativos) e razoavelmente específico (poucos falso-positivos);
- a doença deve ser freqüente e grave o suficiente para justificar a despesa da triagem, ou seja, a triagem deve ter uma relação de custo-benefício.
- a infra-estrutura social deve estar disponível para informar os genitores da criança e os médicos quanto ao resultado do teste de triagem; confirmar os resultados do teste e instituir o tratamento e a informação genética apropriados (THOMPSON e THOMPSON, 2002).

O papel e a amplitude da triagem neonatal estão em expansão. Enquanto a triagem neonatal tradicional se preocupava somente com alguns erros inatos do metabolismo que provocam o retardo mental, hoje vários programas incluem alterações que causam mortes prematuras, doenças infecciosas, distúrbios auditivos e doenças cardíacas (NNSGRC, 2000).

No Seminário Nacional de Saúde da População Negra, ocorrido em Brasília, em 2004, a Secretaria de Atenção à Saúde, através do PNTN, enfatizava que o objetivo de um programa de triagem neonatal é promover a detecção de patologias congênitas em fase pré-sintomática em todos os nascidos vivos, permitindo o tratamento precoce e conseqüentemente diminuindo a morbidade, suas conseqüências (muitas vezes a deficiência mental) e a mortalidade gerada pelas doenças triadas.

As hemoglobinopatias e a fibrose cística preenchem essas condições e por isso foram inseridas nos programas de triagem neonatal já existentes (RAMALHO, MAGNA e PAIVA E SILVA, 2003).

O Instituto Nacional de Saúde (NIH) norte americano, em conferência realizada em abril de 1987, recomendava que os programas de triagem populacionais fossem centralizados em laboratórios específicos para a triagem em massa e também para os diagnósticos confirmatórios, devido aos profissionais especializados e à experiência adquirida da análise de grande número de amostras (WETHERS, 1987).

Portanto, os benefícios dos programas de triagem neonatal incluem: evitar diagnósticos errôneos, oportunidade de profilaxia, tratamento precoce, aconselhamento genético dos pais, triagem dos irmãos e coleta de dados para o planejamento da saúde pública (ARMBRUSTER, 1990; SIQUEIRA et al., 2002). Esses são superiores às desvantagens: diagnóstico equivocado do paciente, interferência nos vínculos pais-filhos, superproteção dos pacientes, ansiedade e sentimento de culpa dos pais, risco de desagregação familiar, descoberta de não-paternidade e custos para a triagem. A triagem neonatal interliga a medicina-ciência com as outras disciplinas como bioética, sociologia e psicologia (ARMBRUSTER, 1990).

2.10.2 Inclusão das Hemoglobinopatias no PTN

Antes da triagem populacional das hemoglobinopatias, o diagnóstico era realizado tardiamente, muitas vezes quando a criança já estava com a saúde comprometida (SIQUEIRA et al., 2002).

A inclusão da pesquisa das hemoglobinopatias, com ênfase na anemia falciforme nos programas de Triagem Neonatal, a partir da Portaria n.º 822 de 6 de junho de 2001, "corrigiu uma antiga distorção" ao adequar a triagem dos distúrbios metabólicos às características étnicas da população brasileira (RAMALHO, MAGNA e PAIVA E SILVA, 2002).

O diagnóstico precoce é fundamental, pois antes do advento do PNTN, 20% das crianças portadoras da anemia falciforme não chegavam aos cinco anos de idade e o restante apresentava uma redução acentuada do rendimento escolar. Com a triagem neonatal, essas crianças passaram a receber tratamento adequado nos primeiros anos de vida, reduzindo as complicações decorrentes da doença (DUCATTI et al., 2001).

A triagem universal evita a rotulação e a discriminação; a anemia falciforme ainda hoje representa um preconceito contra a raça negra (PAIVA E SILVA e RAMALHO, 1997). Porém, o alto grau de miscigenação que ocorre em nosso país invalida a conotação racial das hemoglobinopatias. Ela tem apenas importância histórica, para explicar a introdução das diversas hemoglobinopatias em nosso país por fluxo gênico externo (RAMALHO, MAGNA e PAIVA E SILVA., 2002).

2.11 COLETA DA AMOSTRA

Garrick, Dembure e Guthrie (1973) e Kinney et al. (1989) demonstraram que o sangue coletado por punção do calcanhar ou do dedo, em papel filtro e seco, é especialmente vantajoso para testes em grande escala, pois as amostras podem ser enviadas facilmente pelo correio. Além disso, podem ser utilizadas para outros testes da triagem. Outras vantagens do uso do papel de filtro incluem a facilidade na identificação das amostras, menor custo para a sua coleta e facilidade no seu manuseio para as análises. Powars (1989) considerava ainda que a maior vantagem da coleta do calcanhar do bebê é que esta pode ser realizada sem a necessidade do envolvimento do médico ou de outros membros da equipe técnica da maternidade. Comparativamente, a autora supracitada comenta que a amostra de cordão umbilical, embora seja indolor para a criança e possibilite coletar grande volume de sangue que permitirá repetições por diferentes métodos, requer o envolvimento e participação do corpo obstétrico (POWARS, 1989).

Papadea et al. (1994), publicaram estudo comparativo entre duas técnicas, e dois tipos de amostra de sangue coletado de um mesmo indivíduo: o sangue de cordão, líquido, foi analisado por eletroforese, e o sangue coletado em papel filtro, seco, foi analisado por focalização isoeletrica. O primeiro experimento foi realizado em um laboratório privado e o segundo em laboratório público. Houve concordância em 99,4% dos testes realizados. Verificou-se que maior discordância e amostras inconclusivas ocorreram com as amostras de cordão, além dos erros de transcrição em ambos os métodos. Além disso, a presença de HbA em maior proporção ou a presença de HbA₂, nas amostras de cordão analisadas, sugerem contaminação com o sangue da mãe. Os autores concluíram que as duas técnicas estão sujeitas a erros, mas ambas são adequadas para a triagem neonatal. Entretanto, consideraram relevante que a coleta em papel filtro não perdeu nenhum caso de doença potencial, ou seja, não houve resultados falso-negativos. Esse é um requisito básico para que o método de coleta possa ser utilizado para triagem populacional, principalmente se essa triagem utilizar apenas uma amostra como foi o caso daquele estudo. Por outro lado, houve casos de falsos negativos para doenças clinicamente significantes de fenótipos falcêmicos e β^+ -talassemias em teste realizado em sangue de cordão (PAPADEA et al., 1994).

Lobel et al. (1989) mostraram a experiência do Hospital Infantil em Cincinnati, nos Estados Unidos, em trabalho retrospectivo, realizado no ano de 1985. Nessa época, a coleta de sangue para a triagem de hemoglobinopatias era feita do cordão umbilical e o teste era realizado por eletroforese em pH alcalino e em pH ácido. Os autores relataram falsos positivos e falsos negativos, que serão comentados no item "Falsos positivos e falsos negativos" desse trabalho.

Assim, a coleta de sangue por punção do calcâneo é considerada segura, além de permitir a pesquisa de outras doenças metabólicas já consagradas (DAUDT et al., 2002).

2.12 USO DE ANTICOAGULANTES

A experiência do PTN da Carolina do Norte, nos Estados Unidos, mostra que as amostras coletadas com heparina não apresentaram diferenças significativas na identificação das Hbs F, A, S e C, comparadas com as coletadas em papel filtro, mas após armazenamento a resolução do sangue heparinizado mostrou-se melhor em relação ao sangue seco. A hemoglobina Barts, diagnóstica da α -talassemia, é melhor detectada no sangue heparinizado, pois não é estável em papel filtro (KINNEY et al., 1989).

O sangue coletado com o anticoagulante EDTA é preferível àquele coletado em papel filtro, pois em condições não adequadas de transporte, neste último, a hemoglobina rapidamente se modifica através de oxidações, glicosilações, interações proteína-proteína, produzindo bandas extras no cromatograma, que podem interferir na identificação das hemoglobinas variantes (HUISMAN, 1989).

O sangue líquido é mais fácil de hemolisar, mas o sangue seco é mais fácil de transportar e armazenar.

Frente a esses argumentos, o PTN no Estado do Paraná optou pela coleta de sangue do recém-nascido em papel filtro, pela punção do calcanhar.

2.13 TÉCNICAS PARA A PESQUISA DAS HEMOGLOBINOPATIAS

Os métodos utilizados para a triagem neonatal das hemoglobinopatias devem atender a três requisitos: 1) identificar a HbS; 2) detectar a ausência da HbA, sugestiva de homozigoto FS ou um duplo heterozigoto para S- β^0 -talassemia ou para identificar FS/C ou S/outra variante da β globina; 3) ser capaz de triar outras hemoglobinopatias potencialmente patológicas, como por exemplo, a interação S β^+ -talassemia (GARRICK, 1989).

Como o sangue do recém-nascido é composto por aproximadamente 75% de HbF, os métodos devem ser suficientemente sensíveis para detectar níveis baixos

de hemoglobina normal e anormal, ausência ou pequenas quantidades de HbA e também pequenas quantidades de HbS, HbC, HbD, HbE, e HbO_{Arab}. (CHAPMAN, 1999).

O desafio do diagnóstico neonatal é detectar pequenas quantidades de hemoglobina S em presença de grandes quantidades de hemoglobina F. Se o recém-nascido possui a hemoglobina S, é necessário determinar a presença ou ausência de pequenas quantidades de hemoglobina A para diferenciar entre o traço falcêmico e a doença (PEARSON, 1989).

Crianças com hemoglobinopatias também apresentam uma predominância da hemoglobina F ao nascimento. Resultados diferentes na triagem neonatal podem indicar síndromes falciformes como FS, FSC e eventualmente outros genótipos como FSD_{Punjab}. A identificação da hemoglobina S no recém-nascido reflete uma variedade de genótipos com uma grande diversidade na gravidade clínica. Muitas crianças cuja triagem teve o genótipo FS como resultado, podem ter o genótipo SS, porém é possível também: S β^0 -talassemia, S β^+ -talassemia, S δ/β -talassemia e S-PHHF. A co-herança da alfa-talassemia pode complicar a diferenciação dos genótipos. Por isso, Lane (2001), do Centro de Tratamento e Pesquisa de Anemia Falciforme do Colorado, reiterava que toda criança com teste de triagem com resultado diferente da normalidade, desde que não seja o portador sadio, deveria realizar testes confirmatórios em uma segunda amostra de sangue antes dos 2 meses de idade, o que permitiria precocemente a educação familiar, profilaxia com o uso da penicilina e cuidados com o paciente (LANE, 2001).

As técnicas utilizadas para a detecção de hemoglobinas na rotina laboratorial são: eletroforese em pH alcalino e ácido, teste de solubilidade, focalização isoeletrica, cromatografia líquida de alta resolução e biologia molecular.

2.13.1 Eletroforese em pH Alcalino e Ácido

Na corrida eletroforética convencional, a mistura de proteínas a ser analisada é aplicada em uma estreita zona sobre uma membrana próxima ao cátodo. Uma corrente elétrica direta é aplicada, direcionando a proteína ionizada através de um suporte-matriz (acetato de celulose, agarose, amido, poliacrilamida ou outros), tamponado em um pH específico, geralmente pH 8,6 para eletroforese alcalina e pH 6,2 para eletroforese ácida de hemoglobinas. A proteína ionizada migra em um pH único, a uma velocidade constante porque a carga da superfície da molécula é constante. À medida que o tempo avança, a banda protéica se estende e se torna mais difusa. É um procedimento cronometrado, pois a proteína continua a migrar a menos que a corrente elétrica seja interrompida (HOCKING, 1997).

A migração eletroforética em pH alcalino apresenta hemoglobinas que migram em um mesmo ponto, sendo necessários estudos complementares para sua correta identificação. A hemoglobina G (Philadelphia) é uma variante de cadeia alfa e apresenta mobilidade semelhante à da HbS em pH alcalino (ZAMARRO et al., 2002).

A eletroforese de hemoglobinas é considerada por muitas autoridades como "Gold Standard" para o diagnóstico de hemoglobinopatias, mas pode apresentar dificuldades na determinação da hemoglobina durante o período neonatal, pois em meio alcalino, a HbF tem uma mobilidade intermediária entre a HbA e S. Além disso, grandes quantidades de HbF podem dificultar a identificação precisa das demais. Para esclarecer esse fato, recorre-se então à eletroforese ácida, onde a HbF corre mais à frente, permitindo assim uma melhor definição das HbA e S (PEARSON, 1989).

2.13.2 Teste de Solubilidade

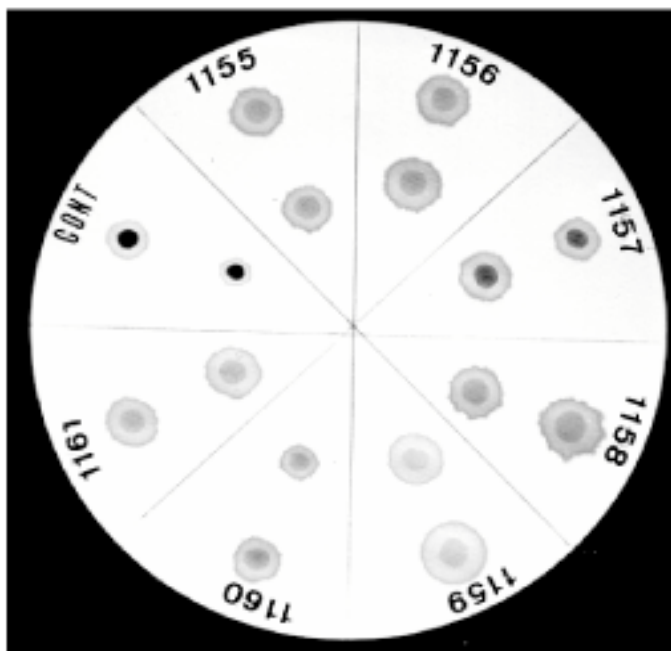
Baseia-se no fato de que sob baixas concentrações de oxigênio, a HbS torna-se 100 vezes menos solúvel do que em sua forma oxigenada. Apresenta boa sensibilidade para a sua detecção em outras faixas etárias que não a do período neonatal.

A técnica utilizada por Bandeira et al. (2003) é a que se segue: 200µl de sangue são colocados em cada poço de uma placa de micro titulação, adicionando-se em seguida 50ml da solução hemolisante constituída de 10mg de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (ditionito de sódio) para cada ml da solução fosfato (K_2HPO_4 -29,66g; KH_2PO_4 - 16,89g; saponina - 1,25 g; 125ml de água destilada). Após homogeneização, devem ser removidos 20ml e aplicados em papel filtro Whartman n.º 6. A leitura do teste deve ser feita a olho nu, um a dois minutos após a aplicação do hemolisado no papel filtro, sendo que nos casos positivos observa-se um centro escuro com um halo mais claro.

A HbS é relativamente insolúvel no tampão inorgânico, enquanto outras hemoglobinas são solúveis. A molécula de hemoglobina normal é um tetraedro composto por 2 cadeias α e 2 cadeias β com assimetria de "espelho" em relação ao eixo central da molécula. Na desoxigenação, ocorre um deslocamento lateral das cadeias beta; na oxigenação, as cadeias betas voltam para junto do eixo. No teste de solubilidade a lise das hemácias, em presença do ditionito de sódio, libera a hemoglobina desoxigenada e a cadeia beta de cada molécula se desloca lateralmente, causando opacidade na leitura do teste.

Os testes de falcização, com o metabissulfito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) e o teste de solubilidade, que utiliza o ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), são limitados e não são capazes de detectar pequenas quantidades de HbS presentes ao nascimento devido à grande concentração de HbF, não permitindo fazer a diferenciação entre o traço e a doença (PRUDÊNCIO, COVAS e BONINI-DOMINGOS, 2000; BANDEIRA et al., 2003).

FIGURA 3 - TESTE DE SOLUBILIDADE REALIZADO EM SANGUE DE CORDÃO UMBILICAL - AMOSTRA REPRESENTATIVA DOS RECÉM-NASCIDOS



FONTE: Bandeira et al. (2003)

NOTA: CONT: controle positivo; 1157: amostra positiva; demais: amostras negativas.

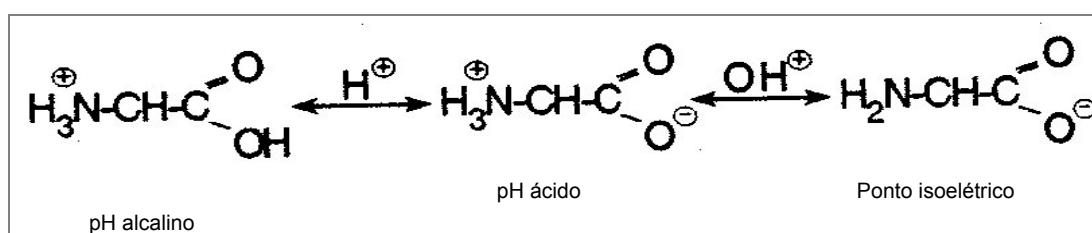
2.13.3 Focalização Isoelétrica

A FIE é a eletroforese em um gradiente de pH. É um procedimento usado para determinar o ponto isoelétrico (pI) de substâncias anfotéricas como os peptídeos e as proteínas. Um gradiente de pH é estabelecido, permitindo que uma mistura de ácidos e bases orgânicos, de baixo peso molecular ou anfólitos, distribua-se por si mesma em um campo elétrico gerado ao longo de um gel (LEHNINGER, NELSON e COX, 2000).

A eletroforese utiliza a energia elétrica (eletro) na forma de corrente elétrica direta para separar (forese) moléculas carregadas eletricamente. No sangue, as proteínas são formadas por uma série de aminoácidos, que possuem propriedades anfotéricas, que são utilizadas na eletroforese. Cada aminoácido é composto de um grupo amino ($-NH_2$), ou $-N$ terminal e o grupo carboxílico ($-COOH$), ou C-terminal. O pH da solução onde esses aminoácidos se encontram é que determina a carga

líquida. A mudança na carga líquida é acompanhada por mudanças bioquímicas para -NH_2 e/ou $\text{-grupos carboxílicos (-COOH)}$ dando-lhes propriedades anfotéricas, pois as proteínas podem ser carregadas positiva ou negativamente. Em pH ácido, o -NH_2 torna-se protonado (-NH^{+3}), produzindo uma carga líquida positiva na proteína, resultando em sua ionização. Em pH alcalino, o grupo -COOH é deprotonado, formando também uma proteína ionizada, -COOH^{-1} . O pH na qual a proteína possui uma carga líquida igual a zero é o ponto isoelétrico (pI) daquela proteína.

FIGURA 4 - PROPRIEDADES ANFOTÉRICAS DO AMINOÁCIDO



FONTE: Hocking (1997)

A melhoria na resolução das bandas menores e a separação de muitas das variantes de hemoglobinas mais comuns foi possível pela introdução de carreadores de anfólitos no procedimento eletroforético e a subsequente evolução da focalização isoelétrica. Neste método, ao gel de agarose são adicionadas inúmeras espécies moleculares de anfólitos sintéticos, não protéicos de baixo peso molecular, com diferentes pontos isoelétricos (pIs). O gel assim preparado apresenta um valor médio de pH fazendo com que somente um dos anfólitos tenha carga nula, sendo que os outros migrarão em direção aos pólos, assim que o campo elétrico for estabelecido. As amostras de hemoglobinas são colocadas no gel através de um dispositivo padrão (*template*) e a corrente elétrica é aplicada. Os anfólitos, então, são ordenados pelo fluxo dessa corrente elétrica. Os anfólitos com pIs superiores ao pH médio inicial migrarão em direção ao cátodo, que é representado por uma tira de papel absorvente embebida em solução básica (etanolamina), e encontrarão valores de pH progressivamente mais elevados até que esses igualem seu pI ao do meio. Neste ponto, a carga resultante da molécula é zero, e o anfólito agora "neutro" não migra mais, permanecendo nesta posição. O mesmo fenômeno, mas de forma inversa,

ocorre com os anfólitos que migram para o ânodo (solução ácida –ácido acético) (MOREIRA et al., 1999). Por isso, é chamada de método de ponto final. Um tempo adicional não irá afetar a corrida (HOCKING, 1997).

Assim, tudo se passa como se inúmeros experimentos eletroforéticos estivessem sendo realizados simultaneamente, uma vez que as proteínas passam por tampões e pHs diferentes ao longo do gradiente (MOREIRA et al., 1999).

A substituição de uma base nitrogenada do códon GAG para GTG no gene da globina beta S, resultará na substituição do ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da globina beta. Isso irá provocar alterações elétricas que permitirão a sua separação no processo eletroforético.

A valina é um aminoácido neutro ($pI \sim 6$), e o ácido glutâmico é carregado negativamente ($pI \sim 2,8$). Esta troca altera o pI da HbS tornando-a carregada menos negativamente ($pI \text{ HbA} = 6,8$, $pI \text{ HbS} > 6,8$), o que resulta em uma mobilidade mais lenta da HbS em relação à HbA (NAOUM e NAOUM, 2004).

A eletroforese por focalização isoelétrica é considerada um método conveniente para detectar variantes da hemoglobina, mesmo quando em baixas concentrações, como ocorre no período neonatal, além de possibilitar a distinção entre o homozigoto e o heterozigoto (DUBART et al., 1980; BEUZARD et al., 1981). Mostrou-se superior à eletroforese em acetato de celulose, pois apresentou melhor resolução e possibilitou a separação da HbS da HbF (KLEMAN, VICHINSKY e LUBIN, 1989; DAUDT et al., 2002).

Para amostras coletadas em papel filtro, a hemoglobina é eluída com uma solução contendo cianeto para inibir a formação de metahemoglobina (MANUAL PERKIN ELMER WALLAC, 2002).

A focalização isoelétrica possui uma excelente resolução para separar hemoglobinas variantes cujos pIs diferem entre 0,02 a 0,001. Seus resultados não dependem da forma de aplicação, do total de proteína aplicada e do tempo de manipulação. Podem ser medidos parâmetros físico-químicos intrínsecos de proteínas variantes, pelos seus diferentes pIs . Essas são as vantagens da FIE sobre a eletroforese tradicional.

Em comparação à cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), a FIE utiliza menor volume de amostra (10 a 50µl para 200 a 300µl) e apresenta maior velocidade de análise: até 80 amostras em cada corrida com duração de 110 minutos. Pelo método de HPLC, demoraria 4 horas.

FIGURA 5 - CUBA E FONTE PARA FIE



FONTE: FEPE-SRTN (2006)

2.13.4 HPLC

O HPLC, cromatografia líquida de alta precisão, tem sido utilizado desde 1980 como um método para separação de hemoglobinas (HUISMAN, 1989).

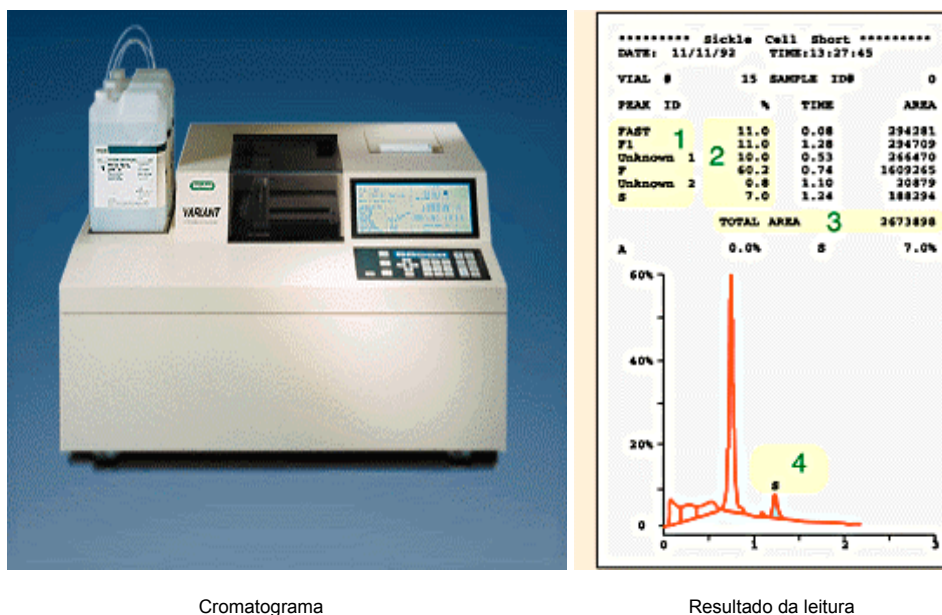
Permite a completa separação das variantes HbE, HbO_{-Arab}, HbC, e HbC-Harlem, que têm mobilidade muito próximas na eletroforese alcalina, o que possibilita que ao nascimento seja possível identificar diversas condições como HbAS, SS, SO_{-Arab}, SC, AC, AE, EE, CC e outros (HUISMAN, 1989).

É um sistema automatizado que utiliza uma mini-coluna preenchida com um polímero de troca catiônica. As amostras são eluídas com água destilada. O sistema utiliza dois tampões de eluição fosfato de diferentes concentrações, que são introduzidas no sistema de fluxo de análise a uma velocidade controlada de 2ml/min. Cada amostra é injetada no sistema de fluxo de análise através de uma sonda

automática. Assim que a concentração da mistura aumenta, a hemoglobina mais fortemente ligada na coluna é eluída (CAMPBELL, HENTHORN e DAVIES, 1999).

Existe um fotômetro com duplo filtro de comprimento de onda que monitora a eluição da hemoglobina da coluna. O primeiro filtro detecta as alterações de absorbância a 415nm. O outro filtro, de 690nm, corrige a linha de base para o efeito provocado pela mistura dos tampões com forças iônicas diferentes. As mudanças das absorbâncias são monitoradas e exibidas como um cromatograma da absorbância versus tempo. Cada hemoglobina tem um tempo de retenção próprio, que é medido do momento da injeção da amostra até o ponto máximo de cada pico. A identificação das hemoglobinas desconhecidas é fornecida através da comparação do tempo de retenção dessas hemoglobinas com o de uma hemoglobina-padrão, analisada pelo mesmo sistema. Um integrador construído executa a redução dos dados brutos colhidos de cada análise. No final da análise de cada amostra, uma cópia do cromatograma e dados do relatório são automaticamente impressos (MANUAL BIO-RAD-VARIANT..., 2003).

FIGURA 6 - HPLC



Cromatograma

Resultado da leitura

FONTE: BIORAD home page (2006)

2.13.5 Biologia Molecular

As modernas técnicas de biologia molecular permitem o diagnóstico rápido e eficiente do gene da hemoglobina S em qualquer célula nucleada, de um embrião implantado com cerca de 10 semanas ou em embrião em fase de pré-implantação (RAMALHO, MAGNA e PAIVA E SILVA, 2002).

A confirmação diagnóstica direta do DNA do papel filtro, como recomendado pelo *National Institute of Health Consensus Development Conference Statement on Sickle Cell Disease and Other Hemoglobinopathies*, possibilita a rápida genotipagem da β -globina. A amplificação do DNA extraído é obtida pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (JINKS et al., 1989).

A técnica da PCR pode ser realizada em indivíduos recentemente transfundidos e é importante para confirmação diagnóstica e diagnóstico pré-natal. Por esta técnica tornou-se possível a amplificação do fragmento específico do gene da globina β que contém o sítio de mutação (exon 1) e posterior digestão com enzima de restrição (FIGUEIREDO, 2003).

As diversas técnicas de biologia molecular para a identificação da mutação β^S demonstram a evolução metodológica obtida nas últimas décadas. A primeira estratégia foi desenvolvida por Kan e Dozy (1978), com a descoberta da presença de diferentes tamanhos do fragmento de restrição (RFLPs) na região flanqueadora do gene da globina β . A descoberta de enzimas de restrição capazes de identificar o ponto de mutação da HbS permitiu a identificação direta do sítio de mutação (FIGUEIREDO, 2003).

Apesar de serem técnicas de alta especificidade, os métodos de biologia molecular ainda são caros para serem usados na prática diária. Porém, avanços na metodologia que os tornem mais rápidos e de menor custo certamente trarão vantagens no uso desta tecnologia (FIGUEIREDO, 2003).

3 TÉCNICAS UTILIZADAS NA TRIAGEM NEONATAL

As técnicas utilizadas para a triagem neonatal devem ter alta taxa de sensibilidade e especificidade para a identificação de recém-nascidos portadores de hemoglobinopatias clinicamente significativas.

Em 1993, a *Agency for Health Care Policy and Research* (AHCPR), órgão pertencente ao governo norte-americano, recomendava a eletroforese de hemoglobinas, focalização isoelétrica e HPLC como métodos sensíveis para a triagem neonatal (ASHLEY-KOCH, YANG e OLNEY 2000).

A focalização isoelétrica e o HPLC possuem as características exigidas pela OMS para uso em teste de triagem populacional e são sugeridas pela Portaria 822 do Ministério da Saúde (MANUAL DE NORMAS TÉCNICAS..., 2005).

Os programas de triagem neonatal em várias partes do mundo usam a associação dessas duas técnicas: no estado da Califórnia, Kleman, Vichinsky e Lubin (1989) recomendam a técnica da focalização isoelétrica para programas com grande número de amostras. Como confirmatório, os autores sugerem a eletroforese em ágar-citrato, ou preferentemente o HPLC. Os autores confirmam em seus artigos que a resolução das hemoglobinas é muito melhor pela focalização isoelétrica e, utilizando-se o sangue de RN, é o melhor método para se estabelecer um resultado definitivo.

Em Bruxelas, Bélgica, Gulbis et al. (1999) relataram a triagem neonatal realizada com o sangue de cordão umbilical e a técnica de focalização isoelétrica. As amostras com frações anormais foram analisadas em gel de acetato de celulose, em pH 8,4; eletroforese em ágar-citrato em pH 6,2 e por HPLC. De 23.136 amostras de recém-nascidos testados, encontraram a prevalência de 1: 87 (1,1%) de traço de hemoglobina S do total da população analisada.

No Estado do Paraná, a técnica de escolha para a triagem inicial é a focalização isoelétrica, sendo o HPLC a técnica confirmatória.

No Estado de Minas Gerais, no programa piloto de hemoglobinopatias, publicado por Paixão et al. (2001) o método de escolha para a triagem inicial era a FIE,

porém, atualmente, o NUPAD realiza a triagem das hemoglobinopatias pelo HPLC e as amostras positivas ou duvidosas são reavaliadas pelo FIE (FERRAZ, 2005).

Em Santa Catarina, o Lacen utiliza as técnicas de focalização isoelétrica e HPLC para a triagem das hemoglobinopatias (CRUZ e VIEIRA, 2005).

Se o HPLC for a metodologia escolhida para triagem de doenças falciformes e hemoglobinopatias, os casos alterados nesta metodologia deverão ser confirmados por focalização isoelétrica e ser igualmente reportados.

Esta é a recomendação da Portaria n.º 822 do Ministério da Saúde.

4 FEPE: SERVIÇO DE REFERÊNCIA EM TRIAGEM NEONATAL

No Paraná, o "Teste do Pezinho" teve início em 1987 por iniciativa do médico neurologista Ehrenfried Ottmar Wittig, com a pesquisa da fenilcetonúria inicialmente em crianças nascidas em Curitiba e região metropolitana e posteriormente em todas as crianças do Estado. Em 1990, a FEPE instituiu a determinação do TSH neonatal ou hipotireoidismo congênito, em todos os recém-nascidos no Estado do Paraná; em 1994, implantou o projeto piloto para a pesquisa da deficiência da biotinidase e, em 1996, passou a realizar esse teste para todo o Estado.

O laboratório de Centro de Pesquisas da FEPE, iniciou em 2000 o programa piloto para hemoglobinopatias e pesquisa da imunotripsina reativa (IRT) para a detecção da fibrose cística, previamente à publicação da Portaria n.º 822 de 06 de junho de 2001, que instituiu no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) o Programa Nacional de Triagem Neonatal. O PNTN orientou a realização de testes de triagem neonatal populacional para fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, fibrose cística e hemoglobinopatias. Os serviços de triagem neonatal foram divididos conforme o grau de complexidade estrutural e de atendimento. No Paraná, o programa da FEPE passou a ser denominado de SRTN-FEPE e foi credenciado na fase III ou de maior complexidade, através da Portaria n.º 354 de 31/08/2001, publicada no Diário Oficial da União como o Serviço de Referência em Triagem Neonatal (SRTN) do Ministério da Saúde para todo o Estado.

O SRTN-PR realiza todas as fases determinadas pelo programa nacional. Seu quadro de pessoal é composto de médico-diretor, bioquímicas, enfermeira, técnicas de laboratório, assistentes sociais, técnicos em informática, secretárias e pessoal de serviços gerais. Para atendimento ambulatorial, acompanhamento aos casos detectados e prestar suporte às famílias, dispõe de equipe multidisciplinar: médicos-pediatras das várias especialidades, nutricionista, psicóloga e assistentes sociais.

Além dos exames preconizados pela Portaria Ministerial, o Estado do Paraná também realiza gratuitamente a pesquisa para a deficiência de biotinidase.

4.1 PROTOCOLO PARA A TRIAGEM DAS HEMOGLOBINOPATIAS - FEPE- SRTN

4.1.1 Coleta de Amostra e Ficha de Coleta

A coleta da amostra de sangue do calcanhar do bebê se dá na alta da maternidade, ou no posto de saúde quando o nascimento ocorre fora do hospital. Geralmente, é realizada entre 24 a 48 horas após o nascimento.

A ficha de coleta é padronizada conforme Anexo 2. Previamente à coleta do sangue, os dados cadastrais devem ser totalmente preenchidos pela enfermagem. Essas informações são importantes para o rastreamento da criança, para uma nova coleta ou qualquer outra intercorrência. Junto à ficha existe o papel filtro específico (Schleicher & Schuell® 903) onde serão depositadas as gotas de sangue. Essa coleta é realizada pela enfermeira ou médico, após rigorosa assepsia, através de punção do calcanhar com lanceta apropriada. A ficha contendo o papel filtro com o sangue do bebê, seco à temperatura ambiente será colocada em envelope com porte pago e enviada ao SRTN via correio.

O controle de entrada de cada exame no laboratório do SRTN é realizado através da Declaração de Nascidos Vivos (DNV). O número que a criança recebe ao sair do hospital permite que ela seja corretamente identificada quando houver mais de uma entrada no SRTN, e que não haja duplicidade na sua identificação.

4.1.2 Problemas na Coleta da Amostra de Sangue

As amostras que tecnicamente não foram coletadas de maneira adequada ou sofreram interferências externas não inerentes ao processo são rejeitadas, sendo solicitada nova coleta. Entretanto, são submetidas à triagem preventivamente, sem a divulgação do resultado. As crianças com resultados alterados nessas amostras são priorizadas na reconvocação.

São consideradas amostras inadequadas aquelas que se apresentam com sangue insuficiente, ressecadas (recebidas no SRTN com 30 dias da data de coleta

ou mais), hemolisadas, com volume excessivo, envelhecidas, comprometidas ou contaminadas (aparência visual fora do padrão de normalidade), colhidas pós-transfusão ou em papel filtro diferente do estabelecido.

É fundamental que a coleta do sangue do bebê seja realizada dentro das normas preconizadas, pois a inobservância, seja do procedimento técnico ou do preenchimento da ficha, poderá comprometer e retardar o início do tratamento em caso de resultados alterados.

4.2 RECEBIMENTO DAS AMOSTRAS E REGISTRO NO SRTN

A ficha, contendo o sangue seco do recém-nascido, é enviada ao SRTN pelo correio. O material é recebido e conferido, cadastrado em sistema informatizado e encaminhado ao laboratório para a realização dos exames.

4.3 LABORATÓRIO DO SRTN

O protocolo para a detecção das hemoglobinopatias é realizado por técnicas de laboratório, sendo que a sua supervisão é realizada pelas farmacêuticas, que então liberam os resultados.

O SRTN da FEPE faz a triagem para hemoglobinopatias de todos os recém-nascidos no Estado do Paraná pelo método da focalização isoelétrica e realiza um segundo teste, confirmatório na mesma amostra, pela técnica de cromatografia líquida de alta resolução, conforme Portaria n.º 822 do MS. Esse segundo teste é realizado sempre que na triagem se apresentar resultado diferente do padrão de normalidade, FA.

4.3.1 Focalização Isoelétrica

Para a triagem inicial, o método de escolha é o de focalização isoelétrica através do Kit FIE da Wallac®. Os equipamentos e materiais utilizados são: unidade

de focalização isoeletrica Wallac, fonte de energia – Wallac, banho de circulação de água, aplicador de amostras – *templates*, gel de agarose, secador de géis, plataforma de agitação, micropipeta monocal (GILSON), *scanner* de Alta Resolução, computador, *software Isoscan* (Wallac), ponteiras, pipetas, Kit RESOLVE de focalização isoeletrica Wallac, ácido tricloroacético (TCA) a 10%.

As variáveis controladas utilizadas para o teste são: temperatura do laboratório (22°C-23°C), temperatura da cuba eletroforética - 14°C, voltagem 1200V, amperagem 300mA e potência 24W.

A amostra de sangue do recém-nascido, coletada em papel filtro, é picotada em picotador automático (diâmetro de três milímetros) em placa seca. São adicionados 15µl de solução de eluição. As amostras são tratadas com solução de cianeto para inibir a formação de metahemoglobina (MANUAL PERKIN-ELMER WALLAC, 2002). As placas são agitadas durante 30 minutos à temperatura ambiente, para eluição. Posteriormente, 5µl do eluato são aplicados no gel através de pipeta multicanal, perfazendo um total de 80 testes por gel.

Nessa etapa também são aplicados os padrões do kit. A corrida eletroforética se desenvolve por 1h50'. As hemoglobinas são fixadas no gel, em solução de TCA a 10%, quando ocorre a sua precipitação (GULBIS et al., 1999). O TCA rompe a molécula de hemoglobina, expondo os aminoácidos hidrofóbicos que irão provocar a sua precipitação (MANUAL PERKIN-ELMER WALLAC, 2002). Em seguida, o gel é lavado e colocado para secar em estufa apropriada a 150°C por 4 horas aproximadamente.

4.3.2 Leitura e Interpretação do Gel

A leitura do gel é realizada sempre por duas farmacêuticas, seqüencialmente, para confirmação dos resultados. A interpretação das bandas das hemoglobinas é realizada visualmente, comparando-as com os padrões conhecidos.

O resultado da presença das hemoglobinas é reportado em ordem decrescente de concentração (WETHERS, 2000; REED et al., 2000).

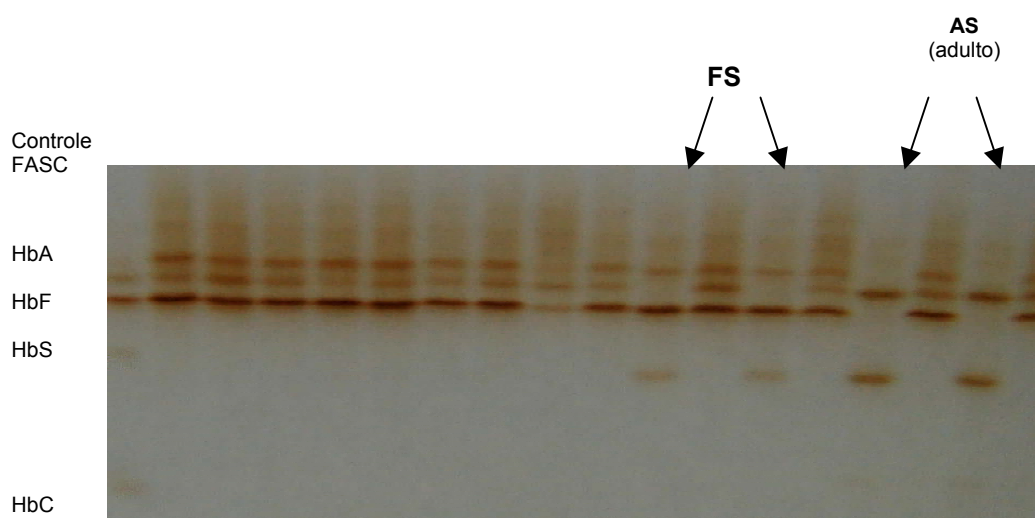
Como a hemoglobina fetal (F) está presente em maior concentração do que a HbA, no recém-nascido normal o valor de referência é HbFA (REED et al., 2000; LANE, 2001; MANUAL DE NORMAS TÉCNICAS, 2005). Crianças com hemoglobinopatias também apresentam predominância da Hb fetal ao nascimento (LANE, 2001). O padrão FS no recém-nascido, isto é HbS na ausência de HbA, pode indicar anemia falciforme – homozigoto SS e também a interação $S\beta^0$ talassemia. O padrão FSC é indicativo da doença falciforme SC: quando a concentração de HbS é maior do que a concentração da HbA (FSA) é sugestivo de $S\beta^+$ talassemia (REED et al., 2000).

Os heterozigotos são FAS, FAC, FAD, FAE, FA+indeterminado. Os homozigotos podem ser FS, FC, FD, FE, e outros.

Outros padrões de leitura podem ser: AA em amostra de criança com mais de 6 meses de idade ou que sofreu transfusão; difuso, quando a quantidade de hemoglobina eluída está abaixo da sensibilidade do teste; não eluído - amostras ressecadas; FA+Ind., hemoglobinas indeterminadas.

Os resultados diferentes de FA são repetidos na mesma amostra em FIE e em HPLC, e os casos ainda duvidosos são confirmados pelo ISOSCAN – leitura dos géis através de um *software* específico.

FIGURA 7 - GEL OBTIDO POR FIE –HEMOGLOBINAS



FONTE: Laboratório de hemoglobinopatias –SRTN – FEPE (2006)

4.3.3 Cromatografia de Alta Precisão - HPLC

Todas as amostras com perfil heterozigoto e de homozigotos diferentes de FA na FIE são analisadas pela técnica de HPLC, para confirmação do resultado.

As amostras são picotadas em picotador automático em placa de 96 poços. São adicionados 200µl de água destilada com agitação por 30 minutos. Após esse tempo, com pipeta multicanal é retirada uma alíquota de 100µl, repassada para outra placa seca e completada para 200µl com água destilada.

O aparelho é programado para o número de amostras a serem analisadas. Os calibradores são colocados e é iniciada a realização dos exames. O tempo de cada teste é de 3 minutos. O controle diário dos cromatogramas é realizado através de marcadores do tempo de retenção (MANUAL BIO-RAD-VARIANT..., 2003).

Resultados de recém-nascidos com o genótipo AA sugerem transfusão ou idade superior a 6 meses. Em caso de transfusão, a criança é reconvocada para repetir o exame após o 3.^o mês de vida. Nas crianças com idade superior a seis meses, o resultado é validado.

O SRTN participa do controle de qualidade internacional do *Center of Disease Control* (CDC), de Atlanta nos Estados Unidos, tanto para as hemoglobinopatias quanto para as outras doenças pesquisadas.

4.3.4 Leitura e Interpretação do HPLC

O tempo de retenção de cada hemoglobina-padrão é registrado no aparelho. A amostra que tiver o mesmo tempo de retenção do padrão é identificada pelo aparelho. O cromatograma correspondente e um laudo constando o tempo de retenção das hemoglobinas identificadas e suas concentrações em porcentagens são emitidos. As hemoglobinas que possuírem tempo de retenção diferente dos padronizados serão identificadas como "desconhecidas".

4.3.5 Interpretação dos Resultados da Triagem Neonatal para Hemoglobinopatias

O objetivo principal da triagem neonatal para hemoglobinopatias é a detecção das doenças falciformes.

Apesar da triagem universal de recém-nascidos ser o método mais confiável para a detecção de crianças com doenças falciformes, não deve ser aceita como definitiva para diagnóstico (STRICKLAND, WARE e KINNEY, 1995).

O teste de triagem neonatal não pretende ser diagnóstico devido às características inerentes da amostra precoce. Por isso, o resultado de hemoglobinopatias da triagem neonatal é presuntivo. Segundo Ferreira (1986), "presuntivo" significa presumível, pressuposto, que se espera que seja.

O sangue do recém-nascido normal apresenta cerca de 80% da sua hemoglobina do tipo fetal (HbF), só atingindo o padrão hemoglobínico típico da respiração pulmonar isto é, 97 a 99% de HbA, 1 a 3% de HbA₂ e < 1% de HbF, por volta dos seis meses de idade. Assim, a confirmação do diagnóstico nesta fase da vida da criança, é imprescindível e a investigação laboratorial de ambos os genitores é desejável. Esta abordagem facilita a detecção de outras doenças falciformes principalmente da S β -talassemia (RAMALHO, MAGNA e PAIVA E SILVA, 2002).

Strickland, Ware e Kinney (1995) confirmam que para um diagnóstico preciso, é necessária uma segunda amostra de sangue para análises detalhadas do DNA da globina. Outros testes laboratoriais como a análise do genótipo da hemoglobina de ambos os pais, ou confirmação do genótipo da triagem e correlação do mesmo com a história clínica e exames físicos devem ser realizados. Nessa publicação, os autores afirmam que a determinação do diagnóstico correto é essencial para o tratamento mais adequado e aconselhamento genético. Os autores exemplificam que o genótipo FS inclui condições clinicamente graves de HbSS e HbS β^0 -talassemia, enfatizado por Lane (2001) e também a condição assintomática da persistência hereditária da hemoglobina fetal associada à HbS. Neste último caso, os indivíduos não são anêmicos e não têm susceptibilidade aumentada para infecções bacterianas e não

apresentam complicações vaso-oclusivas. Clinicamente, são semelhantes aos portadores de HbAS (NAOUM, 1997). Por outro lado, existem pacientes que na triagem neonatal apresentaram o genótipo FS ao invés do esperado padrão FSA, e que no exame confirmatório se apresentam como HbS β^+ talassemia. Em suma, os recém-nascidos que foram identificados com os genótipos FS, FC ou outro genótipo variante de cadeia beta, devem ser retestados mais de uma vez para garantir a precisão do diagnóstico (STRICKLAND, WARE e KINNEY, 1995).

Reed et al. (2000) enfatizam a importância do acompanhamento pós-triagem, para que não haja resultados equivocados em crianças que sofreram transfusões. Cuidados em notificar o serviço de triagem em relação à transfusão, coleta da amostra antes do procedimento transfusional ou repetição do teste de triagem quatro meses após a última transfusão, são algumas das recomendações de Reed et al. (2000).

Os métodos utilizados e a idade precoce das crianças por ocasião da coleta das amostras, permitem o diagnóstico definitivo somente nos casos de doença falciforme da hemoglobina C, SC.

No SRTN-FEPE é solicitada nova amostra em papel filtro, quando a criança é encaminhada para a primeira consulta médica. Essa amostra é necessária para assegurar e descartar a possibilidade de equívocos na hora da coleta no hospital, ou dos dados de identificação na ficha. Entretanto, a confirmação pelo laboratório de triagem não deve ser confundida com diagnóstico (GARRICK, 1989) conforme mencionado anteriormente. Esse deverá ser realizado por outros exames laboratoriais complementares, após os seis meses de idade (DOMINGOS, 2001). Deve-se coletar sangue total da criança e de seus pais biológicos, em tubo contendo anticoagulante EDTA para a realização dos exames laboratoriais: hemograma completo, eletroforese de hemoglobinas, pesquisa de Hb fetal e pesquisa de HbA₂, com a finalidade de diferenciar o homozigoto SS de outras doenças falciformes e principalmente da S β talassemia (RAMALHO, MAGNA e PAIVA E SILVA, 2002).

Os resultados presuntivos da HbS obtidos na triagem neonatal e os diagnósticos possíveis estão discriminados na tabela 2.

TABELA 2 - RESULTADOS PRESUNTIVOS DA TRIAGEM NEONATAL E DIAGNÓSTICOS POSSÍVEIS

RESULTADO	DIAGNÓSTICO POSSÍVEL
FS (Hb Fetal+HbS)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ anemia falciforme ▪ HbS+β-talassemia ▪ HbS+ PHHF
FSA (HbF+HbS+Hb adulto normal)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ HbS+β-talassemia ▪ Traço de hemoglobina S
FAS (Hb fetal+Hb adulto normal+HbS)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Traço HbS – clinicamente benigno mas geneticamente significante
FSC (HbF+ HbS+HbC)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Doença HbSC

FONTE: Adaptado de Michigan Department of Community Health. Disponível em: <http://www.michigan.gov/documents/finalinterpretation_71834_7.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2005

4.3.5.1 Falsos positivos e falsos negativos

Existem fatores que contribuem para que ocorram resultados inconsistentes e também falsos-positivos. Os principais são: identificação equivocada das amostras, omissão de coleta ou obtenção inadequada da amostra descrito no item 4.1.2, erros técnicos nos procedimentos laboratoriais e na definição dos valores de corte utilizados nos testes, prematuridade extrema, transfusão sangüínea previamente à coleta da amostra da criança (LANE, 2001), e quantidade da globina produzida abaixo da capacidade de detecção da técnica (STRICKLAND, WARE e KINNEY 1995).

No recém-nascido com traço talassêmico, os níveis de HbA estarão mais baixos do que o esperado, isto é, a quantidade de globina- β produzida pelo gene da β -talassemia é menor do que a capacidade de detecção das técnicas utilizadas (STRICKLAND, WARE e KINNEY, 1995; CHAPMAN, 1999).

A transfusão produz supressão generalizada da eritropoese endógena por aumento da capacidade carreadora de oxigênio e também aumento de Hb A exógena. Na criança afetada, quanto menor a eritropoese, menor a quantidade de HbS detectável. A aloimunização materno-fetal é outro fator que pode provocar a inibição na produção das células eritróides progenitoras (VAUGHAN et al., 1998).

Não são conhecidos dados sobre a taxa de falsos-negativos dos resultados ditos "normais", para as técnicas de FIE e HPLC utilizadas na triagem neonatal para a detecção de hemoglobinopatias, pois nessas condições esses exames não são rotineiramente repetidos.

Em relação à sensibilidade do método, atribui-se uma taxa de 93,2% para a eletroforese em ágar-citrato e 100% para a focalização isoelétrica (BANDEIRA, 1998).

A taxa de falsos-positivos pela focalização isoelétrica, eletroforese em acetato de celulose seguida de eletroforese em ágar-citrato ou HPLC é de 1:3.000; 97,9% dos resultados positivos são confirmados posteriormente (BANDEIRA, 1998). Por outro lado, Gulbis et al. (1999) salientavam que a técnica da focalização isoelétrica não permitia quantificar as hemoglobinas, mas mostrou possuir sensibilidade e especificidade de 100% (GULBIS et al., 1999).

Lobel et al., em 1989, encontraram dois casos de falsos positivos em duas crianças que posteriormente foram confirmados como sendo FAS e três que confirmaram como FAC, em uma população de 48.000 recém-nascidos triados, 60% a 65% dos quais classificados como da raça negra. Nesse estudo também foram encontrados quatro falsos negativos ("normais"): duas crianças com o fenótipo FAS foram diagnosticadas em idade mais avançada (não citada pelos autores) como $S\beta^+$ -talassemia; uma criança com o fenótipo FAS posteriormente foi confirmada ser HbSS, e uma criança, cujo fenótipo obtido por sangue de cordão como F(0), foi posteriormente confirmada como sendo doença SC (LOBEL et al., 1989).

Mais recentemente, o serviço de triagem neonatal da APAE, de São Paulo, reportou dois casos de RN prematuros que na triagem apresentaram FA, e outro com resultado "inconclusivo" (FA, com HbA em baixa concentração). Na repetição após 120 dias, verificou-se que eram heterozigotos para HbS e HbC (ISKANDAR et al., 2005).

Devido à ocorrência de falsos normais em recém-nascidos com baixo peso e/ou prematuros, o SRTN da FEPE está elaborando protocolo para a confirmação das hemoglobinas de recém-nascidos com essas características. Até o término da dissertação, o novo protocolo ainda não estava disponibilizado.

5 PARÂMETROS UTILIZADOS PARA A DEFINIÇÃO DO DIAGNÓSTICO

Os exames laboratoriais confirmatórios realizados para a definição do diagnóstico dos pacientes que foram detectados pela triagem neonatal foram: hemograma, eletroforese de hemoglobinas (alcalina e ácida), dosagem de hemoglobina A_2 , dosagem de hemoglobina fetal e contagem de reticulócitos. Nessa pesquisa, os parâmetros utilizados para a definição do genótipo "SS" foram: Hb A_2 < 3,6% e VCM superior a 70,0 fL e sendo a contagem de eritrócitos inferior à contagem da interação S β -talassemia. Para a definição da interação S β -talassemia foram utilizados os parâmetros A_2 > 3,5 % e VCM inferior a 70,0 fL (LANSKOWSKY, P., 1995). Além disso, foram analisados os hemogramas em diferentes idades, constantes nos prontuários e cópias enviadas dos outros serviços.

6 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

A população analisada foi constituída pelas crianças triadas pelo SRTN-FEPE, no Estado do Paraná, no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004. Foram selecionados os resultados FS, FSA e FAS, do banco de dados da FEPE. As crianças FS e FSA foram rotineiramente encaminhadas para o ambulatório de hematopediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, para acompanhamento clínico. Os exames confirmatórios, a partir dos seis meses de idade, foram realizados no laboratório do Setor de Ciências da Saúde do Hospital de Clínicas da UFPR, setor de hematologia, que forneceu os dados para análise. Alguns familiares solicitaram acompanhamento clínico em local mais próximo de seus domicílios, onde realizaram exames laboratoriais confirmatórios. Nesses casos, foram analisadas as cópias dos exames realizados naquelas cidades.

6.1 POPULAÇÃO

No período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004, foram triados 548.810 recém-nascidos, provenientes de 446 hospitais-maternidade e 1243 unidades de saúde, pertencentes a 399 secretarias municipais de saúde no Estado do Paraná. Todos os hospitais e maternidades do Estado são cadastrados para a realização do "Teste do Pezinho" na FEPE. Estima-se, por isso, cobertura de 100% dos recém-nascidos vivos no Paraná, além de possivelmente incluir alguns das regiões fronteiriças dos países vizinhos.

O Datasus informa que a população total estimada do Estado do Paraná, no período de 2002 a 2004 foi de 29.840.260 habitantes e a de nascidos vivos foi de 482.094 recém-nascidos (DATASUS, 2006).

Para o cálculo da prevalência, foi utilizado o número de recém-nascidos cadastrados pela DNV, fornecido pelo banco de dados da FEPE. O Estado do Paraná está dividido em 22 Regionais de Saúde e 399 municípios.

TABELA 3 - REGIONAIS DE SAÚDE E SEUS MUNICÍPIOS

REGIONAL DE SAÚDE	MUNICÍPIO	NÚMERO DE MUNICÍPIOS
1. ^a	Paranaguá	7
2. ^a	Metropolitana	29
3. ^a	Ponta Grossa	12
4. ^a	Irati	9
5. ^a	Guarapuava	20
6. ^a	União da Vitória	9
7. ^a	Pato Branco	15
8. ^a	Francisco Beltrão	27
9. ^a	Foz do Iguaçu	9
10. ^a	Cascavel	25
11. ^a	Campo Mourão	25
12. ^a	Umuarama	21
13. ^a	Cianorte	11
14. ^a	Paranavaí	28
15. ^a	Maringá	30
16. ^a	Apucarana	17
17. ^a	Londrina	20
18. ^a	Cornélio Procopio	22
19. ^a	Jacarezinho	22
20v	Toledo	18
21. ^a	Telêmaco Borba	7
22. ^a	Ivaiporã	16

FONTE: Secretaria da Saúde (2005)

6.2 CARACTERÍSTICAS DO ESTUDO

O estudo realizado foi observacional transversal, no qual todas as variáveis (fatores de estudo e efeitos clínicos) foram verificadas em uma única ocasião. Trata-se de um estudo de prevalência. Nesse estudo é realizado levantamento de um grupo de pessoas, algumas das quais portam a doença naquele momento e outras estão sadias. A fração ou proporção do grupo que possui a doença, ou seja, os casos, constituem a prevalência da doença (FLETCHER, FLETCHER e WAGNER, 1996).

Os recém-nascidos selecionados para o estudo foram aqueles que apresentaram a hemoglobina S em homozigose e em heterozigose. Foi analisada a sua distribuição no Estado do Paraná.

6.3 AMOSTRA DA PESQUISA

6.3.1 Critérios de Inclusão

Recém-nascidos triados pela FEPE como FS, FSA, no período de 2002 a 2004, cujo genótipo foi confirmado.

6.3.2 Critérios de Exclusão

Criança detectada na triagem neonatal com o genótipo presuntivo FSA que mostrou ser AS após a realização dos exames confirmatórios;

Criança detectada pela triagem neonatal com o genótipo presuntivo FS que nos exames confirmatórios mostrou ser AS, associado a outra variante de hemoglobina.

7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada através do *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2006).

Na comparação entre os resultados dos exames presuntivos e confirmatórios foi aplicado o Teste de McNemar.

O Teste de Kruskal Wallis, para testes não paramétricos, foi aplicado para verificar se existiu diferença entre a cor da pele e o genótipo FAS.

8 RESULTADOS

Doze crianças apresentaram homozigose SS e quinze, interação S β talassemia. Dezoito crianças são do sexo feminino e nove do sexo masculino.

A comparação entre o resultado presuntivo da triagem neonatal realizada pelo SRTN da FEPE e o exame confirmatório após os seis meses de idade realizado no laboratório da UFPR, HU Londrina, ou laboratórios particulares em outros municípios estão ilustrados nas tabela 4 e 5.

Em relação à heterozigose, 8.321 crianças apresentaram heterozigose para a hemoglobina S.

8.1 DISTRIBUIÇÃO DA ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DO PARANÁ

TABELA 4 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS PRESUNTIVOS DA TRIAGEM NEONATAL E OS EXAMES CONFIRMATÓRIOS PARA HOMOZIGOSE SS REALIZADOS A PARTIR DE 6 MESES (N=12)

PACIENTE NÚMERO	DIAGNÓSTICO	
	Presuntivo	Confirmado
1	FS	SS
2	FS	SS
3	FS	SS
4	FS	SS
5	FS	SS
6	FSA/FS	SS
7	FS	SS
8	FS	SS
9	FS	SS
10	FS	SS
11	FSA	SS
12	FS	SS

Houve concordância estatisticamente significativa entre os resultados presuntivos da triagem neonatal e os resultados confirmatórios, segundo o Teste de McNemar (Anexo 3).

A distribuição dos casos em homozigose – anemia falciforme no Estado do Paraná é apresentada na tabela 5, conforme a regional de saúde e a cidade:

TABELA 5 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS EM HOMOZIGOSE (SS), POR REGIONAL DE SAÚDE E CIDADE

REGIONAL DE SAÚDE	CIDADES	N.º CASOS	N.º CASOS/ 100.000 RN/R. SAÚDE
2. ^a	Curitiba, Campo Largo	3	1,8
3. ^a	Jaguariaíva	1	3,0
5v	Guarapuava	1	3,8
11. ^a	Engenheiro Beltrão	1	5,4
12. ^a	Iporã	1	7,6
14. ^a	Loanda	1	8,2
15. ^a	Sarandi, Atalaia	2	6,9
17. ^a	Londrina	1	2,6
20. ^a	Guaira	1	6,6

Os resultados presuntivos da triagem neonatal e dos exames confirmatórios, realizados após os 6 meses de idade, para a S β -talassemia são apresentados na tabela 6.

TABELA 6 - COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS PRESUNTIVOS DA TRIAGEM NEONATAL E OS EXAMES CONFIRMATÓRIOS PARA OS PACIENTES COM INTERAÇÃO S β (N=15)

PACIENTE NÚMERO	DIAGNÓSTICO	
	Presuntivo	Confirmado
13	FS	S β
14	FS	S β
15	FS	S β
16	FSA	S β
17	FS	S β
18	FS	S β
19	FSA	S β
20	FS	S β
21	FS	S β
22	FS	S β
23	FS	S β
24	FS	S β
25	FSA/FS	S β
26	FS	S β
26	FS	S β

Houve concordância estatisticamente significativa entre os resultados presuntivos da triagem neonatal e os resultados confirmatórios para a interação S β -talassemia, segundo o Teste de McNemar (Anexo 3).

8.2 DISTRIBUIÇÃO DA ASSOCIAÇÃO S β -TALASSEMIA NO ESTADO DO PARANÁ

A distribuição dos casos de interação S β talassemia no Estado do Paraná é apresentada na tabela 7, conforme a regional de saúde e a cidade

TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO DOS CASOS DE INTERAÇÃO S β -TALASSEMIA, POR REGIONAL DE SAÚDE E CIDADE

REGIONAL DE SAÚDE	CIDADES	N.º CASOS	Nº CASOS/ 100.000RN/ R.SAÚDE
2. ^a	Piraquara, Curitiba	2	2,2
5. ^a	Porto Barreiros	1	3,3
6. ^a	Bituruna	1	7,8
7. ^a	Mangueirinha	1	5,9
9. ^a	Foz do Iguaçu	1	3,3
10. ^a	Vera Cruz d'Oeste	1	3,5
15. ^a	Mandaguaçu, Maringá	2	3,4
16. ^a	Marilândia, Apucarana	2	5,9
17. ^a	Londrina, Tamarana	2	2,6
18. ^a	Bandeirantes	1	8,2
19. ^a	Jacarezinho	1	7,4

A figura 8 ilustra a distribuição geográfica dos pacientes SS e S β no Estado do Paraná.

FIGURA 8 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DOS PACIENTES SS E S β NO ESTADO DO PARANÁ -2002- 2004



No período de 2002 a 2004, em números absolutos, a distribuição da anemia falciforme no Estado do Paraná detectada pela triagem neonatal, ocorreu predominantemente na região norte e próximo à capital do Estado. Considerando o número de nascidos vivos por municípios, mostra predominância da doença na região norte e noroeste do estado. A interação S β -talassemia apresentou distribuição semelhante, porém mostrou casos na região sudoeste do estado.

A tabela 8 apresenta a distribuição genótipos SS e S β quanto a cor da pele e respectivas porcentagens.

TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO DOS GENÓTIPOS QUANTO À COR DA PELE

GENÓTIPO	BRANCA		PARDA		NEGRA		N.º	
	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%	Abs.	%
SS	7	58,3	4	33,3	1	8,3	12	100,0
S β	9	60,0	3	20,0	3	20,0	15	100,0
TOTAL	16	59,0	7	26,0	4	15,0	27	100,0

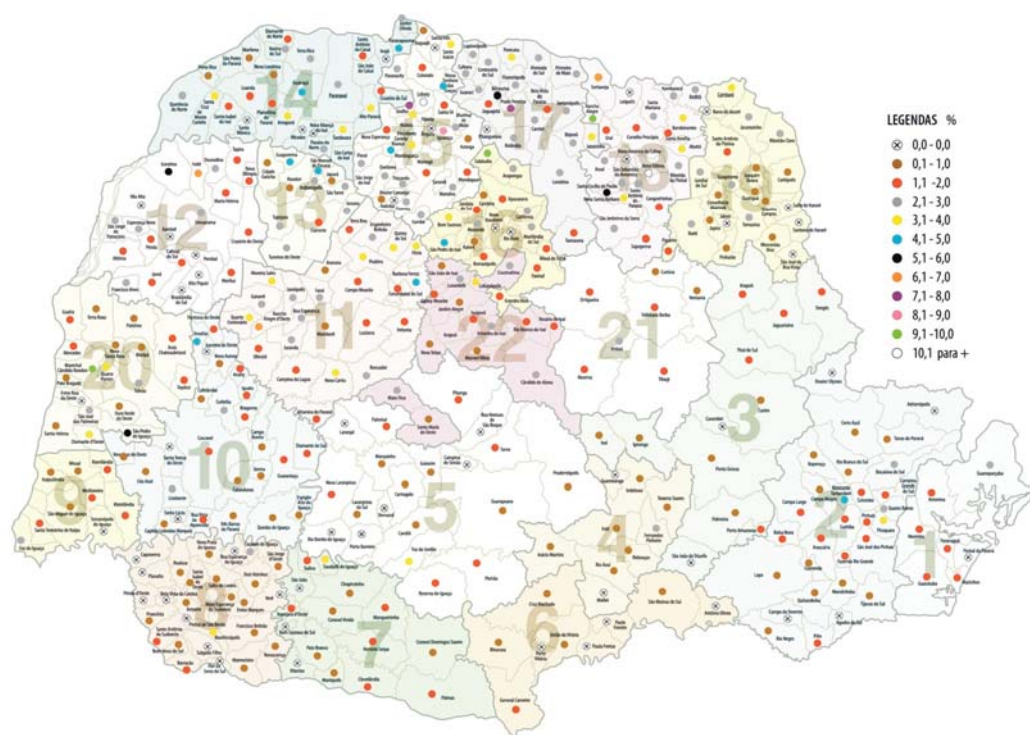
8.3 DISTRIBUIÇÃO DO HETEROZIGOTO DA HbS NO ESTADO DO PARANÁ

A triagem neonatal detectou 8.321 crianças FAS no Estado do Paraná, no período de 2002 a 2004.

O gene da hemoglobina S detectado pela triagem neonatal mostrou-se presente em todo o Estado do Paraná, com freqüências variadas.

A distribuição dos heterozigotos FAS nos municípios está demonstrada no Apêndice 2 e na figura 9 a seguir.

FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DOS HETEROZIGOTOS FAS NO ESTADO DO PR POR MUNICÍPIO - 2002-2004



8.4 CLASSIFICAÇÃO DO HETEROZIGOTO FAS POR COR DA PELE

A tabela 9 apresenta os resultados quanto à classificação dos heterozigotos FAS por cor da pele.

TABELA 9 - CLASSIFICAÇÃO COR DA PELE X HETEROZIGOTOS FAS

COR	N.º DE CRIANÇAS TRIADAS	N.º DE CRIANÇAS "FAS"	% "FAS"
Branca	487.902	6911(83,1)	1,41
Parda	26.957	725 (8,7)	2,68
Negra	3026	152 (1,82)	5,02
Amarela	1595	32 (0,38)	2,00
Não classificada	29330	501(6,0)	1,70
TOTAL	548.810	8321 (100)	1,50

Do total de recém-nascidos vivos triados, 8321 apresentaram-se como FAS (1,5%). Dessas, 6911 (83%) foram classificadas como brancas; 152 (1,82%) foram classificadas como negras; 32 (0,38%) foram classificadas como amarelas; 725 (8,7%) foram classificadas como pardas e 501 (6,0%) não foram classificadas.

A tabela 10 demonstra a prevalência da HbS no Estado do Paraná:

TABELA 10 - PREVALÊNCIA DA HEMOGLOBINA "S" NO ESTADO DO PARANÁ

FENÓTIPO	PREVALÊNCIA (RN VIVOS)
FAS (AS)	1.500: 100.000 (1: 66)
FS (presuntivo)	4,5: 100.000 (1: 21.100)
SS	2,2: 100.000 (1: 45.700)
Interação S β -talassemia	2,7: 100.000 (1: 36.600)
SC	3,3: 100.000 (1: 29.000)

9 DISCUSSÃO

9.1 PREVALÊNCIA DA HbS EM HOMOZIGOSE NO ESTADO DO PARANÁ

A prevalência da anemia falciforme no Estado do Paraná, determinada pelas amostras das crianças que se submeteram ao "Teste do Pezinho" no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2004 é de 2,2: 100.000 recém-nascidos vivos.

O maior número de casos absolutos da doença ocorreu na 2.^a Regional – Metropolitana e na 15.^a Regional – Maringá.

É possível que a presença do gene da HbS esteja relacionada às migrações internas, que propiciaram o deslocamento das populações afro-descendentes, das regiões Nordeste e Oeste do país ao Paraná (PROBST et al., 2000).

A baixa prevalência comparada, da doença no Estado pode ser explicada pela pequena entrada de africanos, na condição de escravos, no Paraná, por este ser considerado um estado economicamente pobre nos séculos XVII e XVIII (PROBST et al., 2000).

Dalaio et al. (2002) compararam o polimorfismo HLA entre uma população da região Norte e Nordeste do Estado, principalmente de Maringá e Londrina (informação verbal de SELL em 23/02/2006), com a de Curitiba. O grupo étnico selecionado na pesquisa foi constituído por brancos com ascendência européia, com provável miscigenação, proveniente de doadores voluntários de medula óssea, cadastrados no "BAMOPAR", além de mães e supostos pais envolvidos em processos de investigação de paternidade, doadores de órgãos para renais crônicos e voluntários. A presença dos haplótipos HLA comumente encontrados em negróides, como A1-B57; A3B35 A23-B44, foi observada nos dois grupos, mas sempre em maior frequência nos grupos das regiões Norte-Nordeste do Estado, caracterizando-se aí maior miscigenação (DALAIO et al., 2002).

TABELA 11 - FREQUÊNCIAS HAPLOTÍPICAS (fh) HLA A-B NA POPULAÇÃO DAS REGIÕES DE CURITIBA E NORTE/NORDESTE DO ESTADO DO PARANÁ

HAPLÓTIPOS	CURITIBA (fh)	NORTE/NORDESTE DO PARANÁ (fh)
A1-B57	0,0093	0,0146
A3-B35	0,0247	0,0356
A23-B44	0,011	0,0198

FONTE: Adaptada de Dalaio et al. (2002)

Segundo o relatório do "Observatório das Metrópoles", a população que reside na região metropolitana de Maringá é constituída por 72,9% de brancos e 24,1% de pretos e pardos. Dependendo do município, esses dados se alteram. Sarandi, por exemplo, possui 31,3% e Paiçandu, 36,5% de negros e pardos. Mandaguaçu, por outro lado, possui 51,4% de negros e pardos e 47,9% de brancos, sendo o único município onde a população branca é menor que a de não brancos (IIPUR/FASE, 2005).

A importância histórica das doenças falciformes incentivou a procura de informações sobre a saúde dos negros vindos da África para o Brasil, na condição de escravos. Figueiredo (1977), Balhana (1977), Chiavenato (1980), Motta (1985), De Boni (1987), Foner (1988), em suas pesquisas sobre a escravidão no Brasil, não fazem referências sobre doenças genéticas ou crônicas, mas apenas sobre mortes provocadas por doenças infecciosas como diarreia e desnutrição, entre outras. Os autores sempre enfatizam o modo de vida tanto dos escravos quanto dos primeiros imigrantes, o sincretismo religioso, o papel da Igreja Católica, o preconceito racial e o sofrimento do imigrante.

9.2 ANEMIA FALCIFORME – TEOREMA DE HARDY-WEINBERG

O teorema de Hardy-Weinberg descreve o comportamento de genes numa população como um todo. Seu enunciado fundamental é o seguinte: "As frequências gênicas e genóticas tendem a permanecer constantes nas populações em panmixia (casamentos ao acaso) e na ausência de fatores evolucionários" (FREIRE-MAIA, 1974).

O teorema permite inferir as frequências dos vários genótipos, mesmo quando alguns deles não podem ser reconhecidos fenotipicamente. Isto é importante, pois permite avaliar a prevalência dos heterozigotos normais, que casados entre si poderão ter descendentes afetados.

Nessa pesquisa, a doença anemia falciforme é rara, isto é cerca de 2,2: 100.000 RN, e os heterozigotos são relativamente comuns: 1: 66. Aplicou-se o teste χ^2 para verificar se as frequências dos genótipos observados estavam em concordância com as esperadas pelo teorema de Hardy-Weinberg, conforme cálculos constantes no Anexo 5. Verificou-se que na população estudada seriam esperados aproximadamente 32 pacientes SS, porém foram encontrados apenas 12, número estatisticamente inferior ao esperado.

Como fatores que podem colaborar para o pequeno número de pacientes recém-nascidos com anemia falciforme no Estado do Paraná, pode-se sugerir: seleção, casamentos preferencialmente inter-étnicos, erros técnicos e de diagnósticos.

9.2.1 Seleção

Pena (2005) em seu artigo "Razões para banir o conceito de raça da medicina brasileira" enfatiza que a anemia falciforme não deve ser considerada "doença de negro" e nem "doença africana", mas sim doença de caráter geográfico, produto da estratégia evolucionária humana para combater a malária, causada pelo *Plasmodium falciparum*. O autor se baseia no fato de que as populações africanas que não fazem parte das regiões endêmicas da malária não apresentam a mutação β^S .

Quando um gene sofre uma mutação, o efeito do novo alelo sobre a característica que ele determina pode ser maléfico, neutro ou benéfico. Em grande parte das situações, as mutações são prejudiciais e por isso são eliminadas pela seleção natural. Se o novo alelo surgido por mutação não for benéfico ou neutro, em geral não poderá aumentar a sua frequência. Porém, não é o que ocorre com o gene da HbS, que atingiu altas frequências, mesmo sendo semi-letal em homozigose.

A explicação de tal fato se deve à pressão do heterozigoto, de tal forma que esse genótipo é relativamente favorecido quanto à viabilidade e reprodução. Por exemplo, nas regiões africanas, onde a malária (principalmente a *P. falciparum*) é endêmica, o heterozigoto para HbS apresenta vantagem de adaptação. O plasmódio, ao penetrar nas hemácias heterozigotas e consumir o oxigênio celular, vai provocar a falcização dessas hemácias, que serão destruídas, eliminando a malária (BEIGUELMAN, 2006). Essa vantagem pode ser explicada como uma estratégia evolutiva ao longo das gerações, que afasta o perigo da extinção da espécie humana pela malária, nas regiões endêmicas. Por outro lado, os homozigotos SS representariam o preço pago pela espécie para continuar a viver em ambiente com malária (FREIRE-MAIA, 1974). Em um ambiente sem malária, os homozigotos SS continuarão a ser semi-letais enquanto os heterozigotos AS não mais desfrutarão da vantagem genética. (FREIRE-MAIA, 1974).

Nascimento (2000) na Bahia observou maior frequência de abortamento espontâneo em mulheres AS (17%) do que em mulheres AA (10%). Ramalho, Magna e Giral di em carta ao editor, confirmam os dados publicados por Nascimento (RAMALHO, MAGNA e GIRALDI, 2006).

Em relação ao efeito seletivo, também se pode citar um estudo norte-americano (TAYLOR et al., 2006) retrospectivo, de 2001 a 2005, no qual constatou-se que as mulheres com traço falcêmico demonstraram incidência significativamente maior de mortes fetais intrauterinas (9,7%), do que as mães com hemoglobina normal (3,5%) ($P = 0,015$). O exame das placentas mostrou falcização nos espaços entre vilosidades (TAYLOR et al., 2006).

Como as mães de recém-nascidos com anemia falciforme são em sua quase totalidade heterozigotas, essa seleção intra-uterina poderia ser a causa da falta de homozigotos SS na presente amostra.

O Datasus informa que, no período do estudo de 2002 a 2004, houve 5.288 óbitos fetais, no Paraná, O número de óbitos fetais corresponde aproximadamente a 1% das crianças nascidas vivas. Se a falta de SS na presente amostra fosse devida

somente a abortos espontâneos, isto significaria que cerca de 63% (20 abortos SS em 32 SS esperados) dos fetos SS não teriam chegado a termo $[20/(548.810 + 20)]$, o que representaria cerca de 0,004% de abortos, em função de o feto ser de genótipo SS. Como a frequência de 63% parece ser muito elevada, pode-se considerar que a falta de homozigotos SS não deve ser apenas por abortos espontâneos dos fetos SS, ou seja de efeito seletivo ao nível do feto.

9.2.2 Casamentos Inter-Étnicos

Os seres humanos, assim como outros animais, vivem em agrupamentos ou aglomerados semelhantes, formando os isolados (FREIRE-MAIA, 1974).

Um isolado pode crescer por dois processos: dentro de suas fronteiras, pela reprodução dos indivíduos que o constituem, e além de suas fronteiras, por migração. Quando os membros desses isolados saem para outros em um processo de migração, ocorre o fenômeno da "quebra dos isolados" alterando a frequência genotípica. A migração diferencial de pessoas de diferentes etnias para diferentes populações vai criar nessas, nova fonte de variabilidade, rompendo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (FREIRE-MAIA, 1974). Importantes quebras de isolados ocorreram no Brasil por ocasião da sua colonização. Houve mudanças de classes sociais em consequência de casamentos, dentro de uma sociedade relativamente estabilizada, e as uniões inter-étnicas ocorreram preferentemente em um dos sentidos (homem europeu e mulher não européia). O êxito na conquista de novas terras, a ausência de mulheres de seus grupos propiciaram o surgimento dessas miscigenações (FREIRE-MAIA, 1974).

No Estado do Paraná, é possível que esteja ocorrendo casamentos entre afro-descendentes e euro-descendentes em maior frequência do que seria esperado probabilisticamente, isto é, esperado pelo acaso. Nesse sentido, como a origem da mutação S foi africana, esse tipo de casamento preferencial com pessoas de outra etnia levaria a uma queda na frequência de casamentos entre dois heterozigotos AS.

Se isso ocorre, a consequência será a queda na frequência da homozigose SS. É possível que seja essa a razão da falta de recém-nascidos SS no Paraná.

9.2.3 Erros Técnicos e Diagnósticos

Os testes de uso no Programa de Triagem Neonatal no Estado do Paraná para a determinação dos genótipos são altamente sensíveis e altamente específicos. Todos os casos diferentes de FA e heterozigotos normais são repetidos em segunda amostra. Os possíveis erros humanos técnicos são minimizados através de educação continuada e trabalho em equipe.

Quanto ao diagnóstico, os pacientes são avaliados a cada consulta e exames laboratoriais são realizados com diferentes idades da criança. Onde não é possível a definição do diagnóstico, outros testes são realizados para a sua confirmação.

9.3 FREQUÊNCIA DO HETEROZIGOTO NO ESTADO DO PARANÁ - COR DA PELE

Considerando a frequência do genótipo (F)AS em relação à cor da pele, verifica-se que o maior número desse encontra-se na cor de pele branca, conforme tabela 9. Porém, comparando-se a frequência do gene da HbS em relação à cor da pele (dados dependentes), observa-se que é maior na cor de pele negra (5,02%) do que na cor de pele branca (1,41%). Essa aparente discrepância pode ser explicada pelo tamanho da população caucasóide no Estado.

Esses dados sugerem que o gene da hemoglobina S, apesar de ser mais prevalente nos indivíduos de cor negra, não deve ser considerado "marcador" de raça, pois ocorre também em indivíduos caucasóides, embora em proporção menor. Os dados obtidos nessa pesquisa, somam-se à declaração de RAMALHO, MAGNA e PAIVA E SILVA, 2002, de que a anemia falciforme não está mais diretamente relacionada à cor negra, tendo apenas importância histórica sobre a origem da doença (RAMALHO, MAGNA e PAIVA E SILVA, 2002).

Ramalho, Magna e Giral di (2006) em carta ao editor, reforçam que a intensa miscigenação no Brasil, assim como as correntes migratórias internas e externas, já dissociaram a HbS da cor da pele dos seus portadores, apesar de ainda ser um marcador étnico de relevância (RAMALHO, MAGNA e GIRALDI, 2006).

9.4 FREQUÊNCIA DA HEMOGLOBINA "S" NOS PTN BRASILEIROS

As frequências do homozigoto e heterozigoto obtidas pelos programas de triagem neonatal nas diferentes regiões brasileiras podem ser visualizadas no quadro 1.

QUADRO 1 - FREQUÊNCIA DE HETEROZIGOTOS E HOMOZIGOTOS PARA Hb S DETECTADAS PELOS PROGRAMAS DE TRIAGEM NEONATAL NO BRASIL E RESPECTIVAS TÉCNICAS LABORATORIAIS

AUTOR	ESTADO	AMOSTRA (N)	FAS (%)	FS (%)	MATERIAL	TÉCNICA DE TRIAGEM	CONFIRMATÓRIO
Adorno et al. (2005)	BA	590	9,8	0,2	⁽²⁾ ST/EDTA	HPLC	Não consta
De Araújo et al. (2004)	RN	1940	1,5	0,05	ST/EDTA	Eletroforese alcalina/ácida	Eletroforese alcalina/ácida/solubilidade/2 meses RN+país
Bandeira et al. (1998)	PE ⁽¹⁾	1988	5,3	0,0	ST/EDTA	Eletroforese alcalina Solubilidade, eletrof. ácida	Eletroforese alcalina+solubilidade +hmg Aos 6 meses
Paixão et al. (2001)	MG	128.326	3,29	0,036	Papel filtro	IEF	IEF aos 6 meses de idade
Sant'Anna (2001)	PR (piloto)	7956	1,26	0,0	Papel filtro	IEF	IEF
Presente trabalho	PR	548.810	1,5	⁽³⁾ 0,002	Papel filtro	IEF/HPLC	País + hemograma, eletroforese Hb, A2, Fetal ao 6 meses
Daudt et al. (2002)	RS (priv)	1.615	1,2 portador gen HbS		Papel filtro	IEF	Eletroforese alcalina/ácida RN + país
Sommer et al. (2006)	RS (Pub)	117.320	1,14	⁽³⁾ 0,0008	Papel filtro	HPLC/IEF	HPLC-β-Thal.+país

FONTE: A autora

(1) Hospital.

(2) ST: sangue total.

(3) Após confirmação.

Na Bahia, a frequência de heterozigotos obtida pelo programa de triagem neonatal foi de 9,8% (ADORNO et al., 2005). No mesmo Estado, em estudo realizado com

doadores de sangue, encontrou-se freqüência de 5,3% de heterozigotos para HbS, considerada a maior freqüência regional de heterozigotos no Brasil (NASCIMENTO e BORJA, 1999). Essa diferença pode ser devida ao tamanho e idade das populações estudadas.

Segundo o Censo 2000 e o Datasus, em 2004 a Bahia possuía população de 13.552.649 habitantes e 9.915.118 (73,16%) eram constituídos de pretos e pardos. Pela população predominantemente negróide, a freqüência de 0,2% (1:500) do genótipo presuntivo FS na triagem de recém-nascidos é considerada uma das maiores no Brasil. A mesma situação ocorre para o heterozigoto, que é de 9,8% (1:10) (ADORNO et al., 2005).

De Araújo et al. (2004), no artigo "Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil", analisando os resultados de 1940 amostras de cordão umbilical, encontraram freqüência de 0,05% (1: 2000) para o genótipo presuntivo FS e 1,5% para o heterozigoto. Na presença de hemoglobina anormal foi realizado estudo familiar, retornando a criança para consulta aos 2 meses de idade. Tanto as amostras dos pais quanto da criança foram submetidas a eletroforese alcalina, ácida e teste de solubilidade (DE ARAÚJO et al., 2004).

Na maternidade de Pernambuco, foram analisadas 1988 amostras de cordão umbilical de recém-nascidos, coletadas com EDTA. A triagem iniciou-se com a eletroforese em pH alcalino e teste de solubilidade e posterior realização da eletroforese ácida. Nos casos onde se confirmou a presença de HbS pela eletroforese ácida foi informado aos pais através de carta, para realizar a eletroforese alcalina, teste de solubilidade e eritrograma aos 6 meses de idade da criança, no hemocentro local, para confirmação do diagnóstico, considerando que nessa idade a presença da hemoglobina fetal já não está tão acentuada (BANDEIRA, 1998).

No programa de triagem neonatal de Minas Gerais, em 128.326 recém-nascidos triados para hemoglobinopatias no período de março a agosto de 1998, foram detectados 46 RN SS (0,036% ou 1: 2790), e 4 com interação S β -talassemia (0,003% ou 1:32.000), confirmados por técnicas de DNA e seguimento clínico laboratorial. A prevalência do heterozigoto FAS foi de 1: 30 (3,3%) (PAIXÃO et al., 2001).

Sant'Anna, em estudo piloto populacional da triagem neonatal para hemoglobinopatias no Estado do Paraná, encontrou frequência de 1,26% de traço falciforme na população analisada de 7.956 crianças. Este estudo foi realizado em recém-nascidos de Curitiba, Antonina, Arapongas, Assai, Araucária, Campina Grande do Sul, Campo Largo, Campo Mourão, Cascavel, Castro, Cianorte, Fazenda Rio Grande, Foz do Iguaçu, Francisco Beltrão, Guarapuava, Jacarezinho, Lapa, Londrina, Marechal Cândido Rondon, Maringá, Morretes, Paranaguá, Pato Branco, Perobal, Pinhais, Ponta Grossa, Rio Negro, São José dos Pinhais, Telêmaco Borba, Toledo, Umuarama e União da Vitória. Na classificação conforme a cor da pele, 61,45% das crianças triadas como heterozigotas foram classificadas como brancas e 32,53% como mulatas claras, havendo predominância da cor branca entre os portadores sadios da hemoglobina S. Não foi detectado nenhum caso de hemoglobina S em homozigose (SANT'ANNA, 2001).

Uma das explicações para a diferença de resultados encontrados por Sant'Anna e o presente estudo pode ser a característica da população analisada. Naquele estudo, foram analisadas as amostras de recém-nascidos de 32 municípios, considerando Curitiba, sua região metropolitana e outras localizações distribuídas no Estado. Portanto, foi analisada uma amostra estratificada. Cada estrato pode apresentar características genéticas próprias, dependendo dos grupos étnicos que lá estão estabelecidos. Outro fator para explicar a diferença pode ter sido o número amostral, bem maior no presente trabalho do que no estudo piloto.

Backes et al. (2005), em levantamento retrospectivo sobre a triagem neonatal no Estado de Santa Catarina, demonstram que, de 40.028 crianças que fizeram o "Teste do Pezinho" no período de 1.º de janeiro a 30 de junho de 2003, três apresentaram o genótipo presuntivo FS (0,007%, 1:13.300) e 353 apresentaram o genótipo FAS (0,88%) (BACKES et al., 2005).

No Estado de Santa Catarina foram triados 294.000 recém-nascidos, de outubro de 2001 a agosto de 2005, e encontrados 18 casos de prováveis doenças falciformes e 2.810 (0,95%) heterozigotos (CRUZ e VIEIRA, 2005).

No estudo piloto na triagem neonatal, realizado por Daudt et al. (2002), em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, a frequência de portadores do gene da hemoglobina S foi de 1,2%, independentemente da raça ou ascendência. No artigo não é citada a frequência do portador sadio ou doente. Por outro lado, em artigo publicado em agosto de 2006, Sommer et al., apresentaram o resultado de um ano de triagem na rede pública do mesmo Estado. Em 117.320 recém-nascidos triados foi encontrada prevalência de 1: 117.320 de anemia falciforme, com confirmação do fenótipo através da análise dos pais, e prevalência de 1: 87 para o heterozigoto FAS.

O Rio Grande do Sul, assim como o Estado do Paraná, possui população predominantemente caucasóide; 12,66% daquela população é considerada negróide (negros e pardos, conforme dados do Censo 2000), o que justifica a baixa prevalência da anemia falciforme naquele Estado.

Foi aplicado o teorema de Hardy-Weinberg sobre os dados publicados pela triagem neonatal de Minas Gerais (PAIXÃO et al., 2001) e Rio Grande do Sul (SOMMER et al., 2006), cujas populações (quadro 1) foram as mais semelhantes ao do presente trabalho (Anexo 5). Com os dados de Minas Gerais, obteve-se um número de pacientes com anemia falciforme maior do que o calculado ou teórico. Por outro lado, no Rio Grande do Sul, foi encontrada uma tendência para menos casos do que o calculado ou teórico. Essas diferenças em relação ao teorema podem ser explicadas pela diversidade de etnias nessas regiões e, provavelmente, pelo fato do casamento preferencial de afro-brasileiros com euro-brasileiros não estar ocorrendo em Minas Gerais, e que pode estar ocorrendo no Rio Grande do Sul e, principalmente no Paraná.

9.5 INTERAÇÃO S β -TALASSEMIA

A prevalência da interação S β -talassemia no Estado do Paraná no período de 2002 a 2004 é de 2,7:100.000 recém-nascidos analisados pela triagem neonatal.

Donin, em 1982, analisou 320 indivíduos moradores de Curitiba, mas nascidos em outros estados brasileiros. Desses, 224 eram parturientes internadas em maternidade e 96 cônjuges respectivos. Foram encontrados 3,15% de traço falcêmico, sem considerar a da cor da pele e 3,75% de traço talassêmico. Naquele trabalho, a autora citava a importância do estudo das interações HbS-talassemias, principalmente nas populações onde existe a miscigenação entre negróides e caucasóides de origem italiana, como nos estados do sul do Brasil. A identificação das interações é importante, pois produz quadros clínicos de gravidades variadas (DONIN, 1982). A alta frequência de heterozigotos naquele estudo pode ter sido determinado pelo número de indivíduos da amostra e a seleção do grupo pesquisado. Os resultados da presente pesquisa corroboram os encontrados por Donin e alertam para a importância de se diagnosticar a interação da HbS.

9.6 MISCIGENAÇÃO

Sob o ponto de vista clínico, a miscigenação trouxe vantagens, pois a associação da HbS com a β^+ -talassemia produz um quadro clínico mais brando, apesar de a interação com a β^0 -talassemia apresentar um quadro tão grave quanto a anemia falciforme.

A miscigenação regional, ainda que indiretamente, pode ser percebida nos trechos abaixo, citados por Angelo Trento: "Os noivinhos de cor não desagradam a muitas das nossas Desdêmonas da gleba, e aliás são preferidos até a italianos de outros compartimentos...." (DE ZETTIRY, 1983⁸ apud TRENTO, 1989), e ainda, segundo

⁸DE ZETTIRY, A. I coloni italiani nello Stato di S. Paolo. **La Rassegna Nazionale**, v.15, p.59-96, 1.º mar. 1893.

Comissariado Geral da Emigração (CGE) "...não são incomuns os casamentos de italianos com negras e, o que é pior, de mulheres italianas com negros...." (TRENTO, 1989).

Nesses trechos, subentende-se que essas uniões podem ter sido a base para a prevalência do heterozigoto (F)AS e da associação da HbS com o fenótipo β -talassêmico.

A interação do gene da HbS e da β -talassemia obtida no Estado do Paraná está de acordo com a miscigenação existente no Estado.

9.7 CLASSIFICAÇÃO POR COR DA PELE

A dificuldade na padronização da "cor da pele" é descrita por Santos-Silva et al. (2005) no artigo "Triagem neonatal como um problema de Saúde Pública". Segundo os autores, os formulários utilizados na coleta do sangue do "Teste do Pezinho", preenchidos de forma errônea ou incompletos que normativamente registravam todas as crianças como brancas; o preconceito das pessoas com sua própria cor; a colonização predominantemente européia da região sul do Brasil são os principais motivos para que a categorização de cor de pele não deva ser considerada nos programas de triagem.

Considerando os critérios de classificação de cor da pele atribuídos pelo IBGE, o item "cor da pele" no presente estudo não foi considerado relevante, pois não houve padronização das características fenotípicas para tal procedimento, sendo a informação fornecida por diferentes profissionais de saúde.

Apesar das considerações acima, a classificação racial registrada nas fichas de coleta do "Teste do Pezinho" do SRTN foi utilizada nesse trabalho. Ainda que os dados não estivessem padronizados, permitiu uma visão global da classificação pela cor da pele no Estado do Paraná.

9.8 TRIAGEM NEONATAL

A triagem neonatal tem por objetivo o diagnóstico precoce das doenças que são triadas. Porém, é fundamental o esclarecimento e o preparo dos profissionais que tratam dessas crianças e de seus pais, pois nas doenças triadas, inicialmente não haverá sinais ou sintomas clínicos. Por esse motivo, da parte dos familiares poderá haver o relaxamento ou não adesão às consultas e orientações clínicas, com prejuízo da saúde da criança. Em relação às hemoglobinopatias, o Ministério da Saúde, no seu Manual de Normas Técnicas (2005), recomenda que os exames confirmatórios sejam realizados aos dois meses de idade, o que possibilita a profilaxia com a penicilina, educação familiar e cuidado com o paciente, conforme preconizado por Lane (2001). Entretanto, é fundamental que o profissional-médico saliente a importância da reconsulta aos seis meses de idade, para a realização de exames confirmatórios, considerando que o diagnóstico da triagem é presuntivo, como mencionado anteriormente. Nesse momento a definição do diagnóstico deverá ser mais precisa.

A amostra dos pais é uma importante ferramenta na elucidação das doenças falciformes, mas pode estar sujeita a erros. Apesar da ênfase em se coletar a amostra dos pais biológicos, pode haver omissão desse fato, voluntariamente ou não. Casos extra-maritais, recusa em fazer o teste, adoções ilegais, roubo de crianças, podem falsear os resultados. Nessa situação, o exame confirmatório molecular tornar-se-ia o mais fidedigno, porém ainda não está disponibilizado na rotina devido ao seu alto custo.

A escolha da inclusão da doença a ser pesquisada pela triagem neonatal está baseada na sua importância na população. Ainda que a prevalência da anemia falciforme seja baixa no Estado do Paraná, em outros Estados do país é importante. Além disso, a frequência significativa do heterozigoto justifica a sua pesquisa e o aconselhamento genético em todos os Estados da nação. É imprescindível o aconselhamento genético aos pais sadios portadores do gene da hemoglobina S que

tenham ou não filhos afetados, devendo-se, porém evitar a rotulação, discriminação e o preconceito. A educação familiar e da comunidade é fundamental para que possam dar apoio e auxílio aos pais que recebem o aconselhamento genético.

A educação continuada aos profissionais envolvidos no manejo desses pacientes deve ser priorizada nos diversos níveis de atuação, para evitar equívocos de aconselhamento e de tratamento.

As hemoglobinopatias falciformes são doenças nas quais os sintomas clínicos são controlados por diversos fatores genéticos e ambientais. O tipo de ocupação, a dieta, a educação, e condições sócio-econômicas influem decisivamente na expressão da doença. Os fatores genéticos que minimizam a gravidade da doença são: a coexistência com a alfa talassemia, o haplótipo do gene β^S , ou a presença da PHHF ou ainda a $\delta\beta$ talassemia (SCHILIRÒ et al., 1990).

O conhecimento dos haplótipos dos pacientes do Estado do Paraná pode trazer informações históricas e também de impacto na Saúde Pública.

É necessária a implantação de laboratório de biologia molecular para a confirmação dos casos onde não é possível definir o diagnóstico por exames laboratoriais de rotina e clinicamente, o que possibilitará melhor acompanhamento e tratamento do paciente.

9.9 CONCORDÂNCIA ENTRE OS RESULTADOS DOS TESTES PRESUNTIVO E CONFIRMATÓRIO

Em relação à anemia falciforme, 10 (83,3%) genótipos FS e dois genótipos FSA (16,6%) confirmaram ser SS após os exames laboratoriais realizados após os 6 meses de idade.

No genótipo FSA, a hemoglobina A apresenta-se em concentração muito próxima ao limite mínimo estabelecido pelo laboratório, na técnica do HPLC. Essa condição pode ser fisiológica, sugestiva da associação S β -talassemia ou pode ser causada pelo fenômeno de "arraste" entre uma amostra e outra.

Em relação à interação S β -talassemia, 11(73,3%) genótipos FS e 4 (26,6%) genótipos FSA mostraram ser interação da HbS com o traço talassêmico β . Pelos resultados obtidos, verificou-se que a interação S β -talassemia pode apresentar-se como FS no recém-nascido, pela precocidade da idade da amostra. Por isso a importância da realização dos exames laboratoriais complementares aos 6 meses de idade para o correto diagnóstico da doença. Sendo possível a realização de técnicas de biologia molecular, essa confirmação pode ser realizada na criança com menos de 6 meses de idade.

Strickland, Ware e Kinney (1995), descreveram um estudo de coorte de 23 crianças onde o genótipo definido pela triagem neonatal diferia do genótipo real. Das 23 crianças, 20 foram definidas como "FS" pela triagem neonatal e na repetição entre 2 semanas a 2 meses, 13 confirmaram o fenótipo SS e 7 apresentaram a interação S β -talassemia. Os outros 3 casos referem-se ao genótipo FC, por isso não foram detalhados nesse trabalho.

A presente pesquisa demonstra a importância do programa de triagem neonatal que além do acompanhamento clínico, inclui a realização dos testes laboratoriais confirmatórios.

9.10 SAÚDE PÚBLICA

Através dos programas de triagem neonatal podem-se conhecer as prevalências não somente das doenças falciformes, mas de todas aquelas que são pesquisadas nesse tipo de pesquisa. O conhecimento da distribuição da doença no Estado do Paraná pode propiciar novas medidas preventivas, curativas e de aconselhamento genético às populações das regiões com maior prevalência da doença. Além disso, medidas de Saúde Pública podem ser desenvolvidas a partir das informações produzidas nessa pesquisa.

O diagnóstico precoce, sobretudo ao nascimento, e o tratamento adequado melhoram drasticamente a taxa de sobrevivência e a qualidade de vida dos portadores

de doenças falciformes. Na anemia falciforme, o simples esquema de vacinação contra o pneumococo e *Haemophilus influenza*, acompanhado de penicilinoterapia profilática, diminui o número de mortes no período crítico, que está situado entre os 6 meses e os 3 anos de idade (DUCATTI et al., 2001).

As crianças FS triadas pela FEPE ou outro genótipo presuntivo de hemoglobinopatia são acompanhadas pelo ambulatório de Hematologia Pediátrica do departamento de pediatria da Universidade Federal do Paraná. O conhecimento do diagnóstico precoce orienta tratamento mais intensivo aos pacientes que se encontram em acompanhamento pela equipe de pediatras, melhorando a sua sobrevida.

10 CONCLUSÕES

1. A prevalência de homozigotos SS, no Estado do Paraná, é de 2,2: 100.000 recém-nascidos vivos. A prevalência de heterozigotos FAS é de 1.500 :100.000 recém-nascidos vivos, ambas menores do que relatado para estados do centro-oeste, norte e nordeste do Brasil. Fatores como tipo de população predominante, óbitos fetais, casamentos preferenciais inter-étnicos podem estar contribuindo para que não haja maior número de homozigotos para a HbS.
2. No período de 2002 a 2004, foram encontradas 21 amostras com o genótipo FS, 4 FSA e 2 FSA/FS na triagem neonatal, no Paraná.
3. Houve concordância entre o diagnóstico presuntivo e os exames confirmatórios em 93 % dos casos.
4. Em 15 casos, foi possível confirmar a associação S β -talassemia, mostrando prevalência de 2,7: 100.000 RN vivos. Portanto, o gene da HbS apresenta-se associado ao gene da β -talassemia, em 55,5% dos casos detectados pela triagem neonatal, sugerindo fortemente ser resultado da miscigenação entre afro-descendentes com descendentes europeus mediterrâneos.
5. A distribuição geográfica dos RN com SS, S β -talassemia e (F)AS, de acordo com as vinte e duas Regionais de Saúde do Estado do Paraná, demonstrou que a anemia falciforme detectada pelo Programa de Triagem Neonatal sugere estar mais prevalente na região norte e capital do Estado; a associação S β -talassemia também sugere estar mais prevalente na região norte do estado, podendo também encontrar alguns casos na região sudoeste; o genótipo (F)AS, encontra-se presente em todo o Estado, porém com maior frequência na região norte. A distribuição geográfica das doenças analisadas serão melhor definidas à medida que novos casos forem confirmados.

6. No Estado do Paraná, o gene da HbS é mais prevalente na população negróide, mas o genótipo (F)AS é mais freqüente na população caucasóide.
7. O mapeamento dos casos de anemia falciforme, das interações S β -talassemia e do heterozigoto sadio no estado do Paraná, poderá contribuir para incrementar as ações sociais e de saúde pública já existentes, trazendo impacto no âmbito social e político.

REFERÊNCIAS

ADORNO, E. V.; COUTO, F. D.; NETO, M. J. P.; MENEZES, J. F.; REGO, M.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast, Brazil. **Cad. Saúde Pública.**, v.21, n.1, p.292-298, 2005.

AMANULLAH, A.; HANASH, S.; BURNELL, K. et al. Cord blood screening for haemoglobin disorders by HPLC. **Analytical Biochemistry**, v.123, p.402-407, 1982.

ARAÚJO, A. S.; GIVISIEZ, C. B; GUERRA, C. C. C. et al. **Doença falciforme: o que é? Como diagnosticar? Como tratar?** Coordenação de sangue e hemoderivados do M.S. Editado por Marjan Farmacêutica, 1993. (folheto)

ARMBRUSTER, D. A. Neonatal hemoglobinopathy screening. **Lab. Med.**, v.21, n.12, p.815-819, 1990.

ASHLEY-KOCH, A.; YANG, Q.; OLNEY, R. S. Sickle hemoglobin (HbS) allele and sickle cell disease. **Am. Journal Gen.**, v.1, n.151, p.839-845, 2000.

BACKES, C. E.; MALMANN, F. G.; DASSI, T.; BAZZO, M. L.; SANTOS-SILVA, M. C. Triagem neonatal como um problema de saúde pública. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.27, n.1, p.1-7, 2005.

BALHANA, A. P. **Famílias coloniais**. Curitiba, 1977. 316p. Tese (Concurso Professor Titular) -Departamento de História, Setor de Ciências Humanas Letras e Artes, Universidade Federal do Paraná.

BANDEIRA, F. M. G. C. **Prevalência da hemoglobina "S" em recém-nascidos no Instituto Materno Infantil de Pernambuco-IMIP: importância do diagnóstico neonatal**. Recife, 1998. 85p. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Universidade Federal de Pernambuco.

BANDEIRA, F. M. G. C.; LEAL, M. C.; SOUZA, R. R.; FURTADO, V. C.; GOMES, Y. M. Diagnóstico da hemoglobina S: análise comparativa do teste de solubilidade com a eletroforese em pH alcalino e ácido no período neonatal. **Rev. Bras. Saúde Mater. Infant.**, Recife, v.3, n.3, p.1-8, 2003.

Begliuomini, H. Priapism due to "S" and "C" hemoglobinopathy successfully treated with finasteride. **Braz. Journal Urol.**, v.27, n.4, p.475-477, 2001.

BEIGUELMAN, B. **Genética de populações humanas**. Disponível em: <<http://lineu.icb.usp.br/bbeiguel/GeneticaPopulacoes/>>. Acesso em: 27 out. 2006.

BEUZARD, Y.; GALACTEROS, F.; BRACONNIER, F.; DUBART, A. et al. Isoelectric focusing of human hemoglobins. **Adv hemogl. Anal.**, v.60, p.177-195, 1981.

BIANCO, I.; SILVESTRONI, E. **Scoperta e sviluppi delle conoscenze sulle microcitemie (talassemia) in Italia**. Disponível em: ,http://www.comune.fe.it/apis/risorse/microcitemie_silvestroni_bianco_9_mar_01.html>. Acesso em: 13 set. 2006.

BIORAD HOME PAGE. Acesso em: 11 maio 2006.

BLACK, J. An isoelectricfocusing method to detect hemoglobin variants in newborn blood samples including the β -thalassemias. **Hemoglobin.**, v.12, n.5, p.681-689, 1988.

BRAIDO, J. F. **O bairro que chegou num navio – Santa Felicidade – centenário**. Curitiba: Lítero-Técnica, 1978. 93p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n.º 1376 de 19 de novembro de 1993. Aprova alterações na Portaria n.º 721/GM, de 09.08.89, que aprova Norma Técnicas para coleta, processamento e Transfusão de Sangue, componentes e derivados e dá outras providências. **Diário Oficial do Brasil**, Brasília, 2 dez. 1993. Seção I, p.18405.

_____. Ministério da Saúde. Coordenação de sangue e hemoderivados. Programa de anemia falciforme. **Portaria n.º 951 de 10/05/1996**. Brasília, 1996.

_____. Ministério da Saúde. Sub comitê de anemia falciforme. Grupo interdisciplinar de anemias hemolíticas hereditárias. **Manual do paciente com doença falciforme**. COSAH. Brasília, 1998.

_____. Ministério da Saúde. **Portaria n.º 822 de 6 de junho de 2001**. BRASÍLIA (DF), 2001a. 29p.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de saúde. **Manual de Doenças mais importantes, por razões étnicas, na população brasileira afro-descendente**. Brasília (DF), 2001b. 78 p.

_____. Resolução RDC n.º 343 de 13 de dezembro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico para a obtenção, testagem, processamento e Controle de Qualidade de Sangue e Hemocomponentes para uso humano, que consta como Anexo I. Brasília, 2002. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php>>. Acesso em: 20 dez. 2002.

_____. Resolução RDC n.º 153 de 14 de junho de 2004. Aprova o Regulamento Técnico para os procedimentos hemoterápicos, incluindo a coleta, o processamento, a testagem, o armazenamento, o transporte, o controle de qualidade e o uso humano de sangue e seus componentes, obtidos do sangue venoso, do cordão umbilical, da medula óssea. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/sangue/legis/resolucoes.htm>>. Acesso em: 13 jun. 2005.

BRUGNARA, C. Red cell dehydration in pathophysiology and treatment of sickle cell disease. **Curr Op. Hematol.**, n.2, p.132-138, 1995.

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, Massachussets, v.337, n.11, p.762-769, 1997.

CAMPBELL, M.; HENTHORN, J. S.; DAVIES, S. C. Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal haemoglobinopathy screening. **Clinical Chemistry**, v.45, n.7, p.969-975, 1999.

CAMPOS, S. R. **Genepop**. Disponível em: <http://genepop.eugenics.com.br/doc/aula06_estruturapopulacao.doc 2006>. Acesso em: 14 nov. 2006.

CHAPMAN, C. S. Neonatal screening for haemoglobinopathies. **Clin. Lab. Haem.**, v.21, p.229-234, 1999.

CHARACHE, S.; DOVER, G. J.; MOYER, M. A.; MOORE, J. W. Hidroxyurea-induced augmentation of fetal hemoglobin production in patients with sickle cell anemia. **Blood**, v.69, p.109-16, 1987.

CHIAVENATO, J. J. **O negro no Brasil da senzala à guerra do Paraguai**. São Paulo: Brasiliense, 1980. 260p.

CRUZ, N. S. O.; VIEIRA, C. Incidência da anemia falciforme e outras hemoglobinopatias em Santa Catarina no período de outubro/2001 a agosto/2005. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TRIAGEM NEONATAL, 3., 2005, São Paulo. **Revista Médica de Minas Gerais**, Minas Gerais: Coopemed, 2005. 111 p.

DALAIO, M. M. O.; SELL, A. M.; TODA, L. Y.; CANO, M. F. F.; SOSSAI, C. R.; FRACALOSSO, L. Frequência dos antígenos HLA-A e HLA-B em populações das regiões de Curitiba e Norte/ Nordeste do Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, Maringá, v.24, n.3, p.743-748, 2002.

DATASUS. Disponível em: <<http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>>. Acesso em: 30 nov. 2006.

DAUDT, L. E.; ZECHMAISTER, D.; PORTAL, L.; NETO, E. C.; ROCHA S, L. M.; GIUGLIANI, R. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: um estudo piloto em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad. Saúde Pub.**, Rio de Janeiro, v.18 n.3, p.833-841, 2002.

DAVIES, S. C.; ROBERTS-HAREWOOD, M. Blood transfusion in sickle cell disease. **Blood Reviews**, v.11, p.57-71, 1997.

DE ARAUJO, M. C. P. E.; SERAFIM, E. S. S.; JUNIOR, W. A. P. C.; DE MEDEIROS, T. M. D. Prevalência de hemoglobinas anormais em recém-nascidos da cidade de Natal, Rio Grande do Norte, Brasil. **Cad. Saúde Pub.**, v.20, n.1, p.123-128, 2004.

DE BONI, L. A. **A presença italiana no Brasil**. Porto Alegre: Fondazione Giovanni Agnelli, 1987. 399p.

DE SÁ, V.; FREIRE, V. T. Saúde pública ignora doença hereditária mais comum no Brasil. **Folha de São Paulo**, 19 jan. 1997.

DESAI, D. V.; DHANANI, H. Sickle cell disease: history and origin. **The internet journal of hematology**, v.1, n.2, p.1-6, 2004.

DI NUZZIO, D. V. P.; FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v.80, n.5, p.347-54, 2004.

DINIZ, D.; GUEDES, C. Anemia falciforme: um problema nosso. Uma abordagem bioética sobre a nova genética. **Cad. Saúde Pública**, v.19, n.6, p.1-13, 2003.

DOMINGOS, C. R. B. Diagnóstico laboratorial das doenças falciformes em neonatos e após sexto mês de vida. In: ANVISA. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília: ANVISA, 2001. 142p.

DONIN, C. **A frequência do traço falcêmico e de talassêmico em uma amostra da população de Curitiba**. Curitiba, 1982. 85p. Dissertação (Mestrado em Genética) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

DOVER, G. J.; HUMPHRIES, R. K.; MOORE J. G. et al. Hydroxyurea induction of hemoglobin F production in sickle cell disease: relationship between cytotoxicity and F cell production. **Blood**, v.67, p.735-38, 1986.

DUBART, A.; GOOSSENS, M.; BEUZARD, Y.; MONPLAISIR, N.; TESTA, U.; BASSET, P.; ROSA, J. Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies: comparison of the results obtained by isoelectric focusing of hemoglobins and by chromatography of radioactive globin chains. **Blood**, v.56, p.1092-1099, 1980.

DUCATTI, R. P.; TEIXEIRA, A. E. A.; GALÃO, H. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; FETT-CONTE, A. C. Investigação de hemoglobinopatias em sangue de cordão umbilical de recém-nascidos do Hospital de Base de São José do Rio Preto. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.23, n.1, p.23-29, 2001.

FABRON JR., A. Clínica e tratamento das doenças falciformes. In: NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997. p.48-60.

FERRAZ, M. H. C. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: o que vem a seguir? In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TRIAGEM NEONATAL, 3., 2005, Belo Horizonte. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 111p., 2005.

FERREIRA, A. B. H. **Novo dicionário Aurélio da língua portuguesa**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 1986. 1838 p.

FIGUEIREDO, A. **O negro e a violência do branco: o negro em Sergipe**. Rio de Janeiro: José Álvaro, 1977. 120p.

FIGUEIREDO, M. S. Situações de emergência. In: ANVISA. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília: ANVISA, 2001. p.71-77.

_____. Biologia molecular na triagem neonatal da doença falciforme. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TRIAGEM NEONATAL, 2., 2003, Belo Horizonte. **Revista Médica de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 130p., 2003.

FIORAVANTE, C. Efeitos da diversidade. **Pesquisa Fapesp**, São Paulo, v.102, p.42-45, 2004.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; WAGNER, E. H. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais**. Porto Alegre: Artmed, 1996. 281p.

FONER, E. **Nada além da liberdade: a emancipação e seu legado**. Rio de Janeiro: Paz e Terra, 1988. 184p.

FREIRE-MAIA, N. **Genética das populações humanas**. São Paulo: Hucitec, 1974. 216p.

FUCHAROEN, S.; WINICHAGOON, P.; ISEDPANICHKIJ, R. et al. Prenatal and postnatal diagnoses of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. **Clinical Chemistry**, v.44, p.740-748, 1998.

GARRICK, M. D. Alternative methods for screening. **Pediatrics**, v.83, p.855- 857, 1989. (Supplement)

GARRICK, M. D.; DEMBURE, P.; GUTHRIE, R. Sick cell anemia and other hemoglobinopathies – procedures and strategy for screening employing spots of blood on filter paper as specimens. **N. Engl. J. Med.**, v.288, n.24, p.1265-1268, 1973.

GASTON M. H.; VERTER, J. I.; WOODS, G.; PEGELW, C.; VICHINSKY, E. et al. Prophylaxis with oral penicillin in children with sickle cell anemia: a randomized trial. **N. Engl. J. Med.**, v.314, n.25, p.1593 -1599, 1986.

GONÇALVES, M. S.; BONFIM, G. C; MACIEL, E.; CERQUEIRA, I. et al. β^S - haplotypes in sickle cell anemia patients from Salvador, Bahia, Northeastern Brazil. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.36, n.10, p.1283-1288, 2003.

GREENGROSS, P.; HICKMAN, M. G.; DUGAN, B.; DAVIES, S. C. Outcomes of universal antenatal screening for hemoglobinopathies. **J. Med. Screen.**, v.6 n.1, p.3-10, 1999.

GUALANDRO, S. F. M. Lesões osteoarticulares na doença falciforme. In: ANVISA. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília: ANVISA, 2001. p.92-97.

GULBIS, B.; TSHILOLO, L.; COTTON, F.; LIN, C.; VERTONGEN, F. Newborn screening for haemoglobinopathies: the Brussels experience. **J. Med. Screen.**, v.6, n.1, p.11-15, 1999.

HOCKING, D. R. **The separation and identification of hemoglobin variants by isoelectric focusing electrophoresis**: an interpretative guide. Georgia (USA): Medical College of Georgia, 1997.

HUISMAN, T. H. J. Usefulness of cation exchange high performance liquid chromatography as a testing procedure. **Pediatrics**, p.849-851, 1989. (Supplement)

IANNI, O. **As metamorfoses do escravo**. 2.ed. Curitiba: Scientia et labor, 1988. 271p.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2002). Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/08052002tabulacao.shtml>>. Acesso em: 09 ago. 2005.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (2004). Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Estimativas_Projeções_população/Estimativas_2004>. Acesso em: 04 ago. 2006.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://revistaepoca.globo.com/Revista/Epoca/0,,EDG66225-6009-328,00.html>>. Acesso em: 04 ago. 2006.

IPPUR - INSTITUTO DE PESQUISA E PLANEJAMENTO URBANO E REGIONAL/ FEDERAÇÃO DE ÓRGÃOS PARA ASSISTÊNCIA SOCIAL E EDUCACIONAL (FASE) – **Projeto análise das regiões metropolitanas do Brasil**. Relatório das atividades 2005. Disponível em: <http://www.observatoriodasmegacidades.ufrj.br/como_anda/como_anda_RM_maringa.pdf>. Acesso em: 23 out. 2006.

ISKANDAR, M. A. M.; HADACHI, S. M.; TOSTES, M. A. et al. Triagem neonatal para hemoglobinopatias em recém-nascidos prematuros. É necessário repetir o teste? Relato de três casos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE TRIAGEM NEONATAL, 3., 2005, São Paulo. **Rev. Méd. M. G.**, Minas Gerais: Coopemed, 111 p.

JINKS, D. C.; MINTER, M.; TRAVER, D. A. et al. Molecular genetic diagnosis of sickle cell disease using dried blood specimens on blotters used for newborn screening. **Hum. Genet.**, v.81, p.363-366, 1989.

JOHNSON, F.; LOOK, A.; GOCKERMAN, J. et al. Bone marrow transplantation in a patient with sickle cell anemia. **N. Engl. J. Med.**, v.311, p.780-783, 1984.

KAN, Y. M.; DOZY, A. M. Polymorphism of DNA sequence adjacent to human β -globin structural gene: relationship to sickle mutation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.75, p.5631-5635, 1978.

KINNEY, T. R.; HELMS, R. W.; O'BRANSKI, E. E. et al. Safety of hydroxyurea in children with sickle cell anemia: results of the HUG-KIDS study, a phase I/II trial. **Blood**, v.94, n.5, p.1550-1554, 1999.

KINNEY, T. R.; SAWTSCHENKO, M.; WHORTON, M. et al. Techniques' comparison and report of the North Carolina experience. **Pediatrics**, v.83, p.843-847, May 1989. (Supplement)

KLEMAN, K. M.; VICHINSKY, E.; LUBIN, B. H. Experience with newborn screening using isoelectric focusing. **Pediatrics**, v.83 (Sup2), p.852-854, 1989.

LANE P. A. **Newborn screening for hemoglobin disorders**. Colorado, 2001. Disponível em: <<http://sickle.bwh.harvard.edu/screening.html>>. Acesso em: 28 jul. 2004.

LANSKOWSKY, P. Manual of pediatric hematology and oncology., 1995.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 839p.

LISOT, C. L. A.; SILLA, L. M. da R. Triagem de hemoglobinopatias em doadores de sangue de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil: prevalência em área de colonização italiana. **Cad. Saude Pública**, v.20, n.6, p.1-13, 2004.

LLOYD-PURYEAR, M. A.; FORSMAN, I. Newborn screening and genetic testing. **JOGNN**, v.31, p.200-207, 2002.

LOBEL, J. S.; CAMERON, B. F.; JOHNSON, E.; SMITH, D.; KALINYAK, K. Value of screening umbilical cord blood for hemoglobinopathy. **Pediatrics**, v.83 n.5, p.823-826, 1989.

MANUAL BIO-RAD-VARIANT SICKLE CELL SHORT PROGRAM INSTRUCTION 2003. 18p.

MANUAL DE DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DE DOENÇAS FALCIFORMES. M.S. Brasília: ANVISA, 2001. 142p.

MANUAL DE NORMAS TÉCNICAS E ROTINAS OPERACIONAIS DO PROGRAMA NACIONAL DE TRIAGEM NEONATAL. Brasília (DF): Ministério da Saúde, 2005. 127 p.

MANUAL PERKIN-ELMER WALLAC Inc. **Hemoglobin test kit**. Directions for use. Norton, feb. 2002.

MARCONDES, G. G.; DE ABREU, A. T. G. **Escravidão e trabalho**. Guarapuava: Fundação Universidade Estadual do Centro-Oeste-Unicentro, 1991.

MARQUESE, R. de B. A dinâmica da escravidão no Brasil: resistência, tráfico negro e alforrias, século XVII a XIX. **Novos estudos-CEBRAP**, v.74, p.107-123, 2006.

MICHIGAN. Department of Community Health. **Interpretation of newborn hemoglobin screening results**. Disponível em: <http://www.michigan.gov/documents/finalinterpretation_71834_7.pdf>. Acesso em: 07 jun. 2005.

MIGUEL, D. C.; COSTA, F. C.; MOURA, F. P. et al. Crescimento na criança com anemia falciforme. **Boletim SBEM BAHIA**, p.18-24, 2002.

MOLLISON, P. L. **Blood transfusion in clinical medicine**. London: Oxford Blackwell, 1972.

MOREIRA, H. W.; MONTEIRO, S. C. M.; MARQUES, T. C.; OLIVEIRA, F. S.; BERTHOLO, L. C.; GIMENEZ, I. C. Triagem das hemoglobinopatias por isoeletrofocalização. **J. Bras. Patol.**, v.35, n.3, p.141-145, 1999.

MOREIRA, H. W.; NAOUM, P. C.; FERREIRA, R. R. et al. Distribuição dos fenótipos das hemoglobinas no Vale da Ribeira, São Paulo. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v.25; n.3, p.76-79, 1989.

MORENO, N.; MARTINEZ, J. A.; BLANCO, Z. et al. Beta-globin gene cluster haplotypes in Venezuelan sickle cell patients from the State of Aragua. **Genetics and Molecular Biology**, v.25, n.1, p.21-24, 2002.

MOTTA, R. Os afro-brasileiros. In: CONGRESSO AFRO-BRASILEIRO, 3., 1985, Recife. **Anais...**, Recife: Massangana- Fundação Joaquim Nabuco, 1985. 160p.

NAOUM, P. C. **Eletroforese**: técnicas e diagnósticos. São Paulo: Santos, 1990. 174p.

_____. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997. 171p.

_____. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.22, n.1, p.05-22, 2000.

NAOUM, P. C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Doença falciforme no Brasil. origem, genótipos, haplótipos e distribuição geográfica. **J. Bras. Patol.**, v.33, n.3, p.145-153, 1997.

NAOUM, P. C.; ISIQUI, W. D.; PAGOTTO, R. de C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Prevalência de hemoglobinopatias em amostras de proveniência diferenciada. **Bol. Soc. Brás. Hematol. Hemoter.**, v.11, n.153, p.69-72, 1989.

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Doenças das células falciformes**. São Paulo, Sarvier, 2004. 224 p.

NASCIMENTO, M. L. P. Abortos em mulheres portadoras de Hemoglobina S. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.22, n.3, p.424, 2000.

NASCIMENTO, M. L. P.; DA SILVA, L. L. O diagnóstico das hemoglobinopatias e beta/talassemias através de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC). **NewsLab.**, v.69, p.168-186, 2005.

NASCIMENTO, M. L. P.; BORJA, M. M. P. Portadores de hemoglobina S: um estudo comparativo entre vários serviços de hemoterapia brasileiros e o impacto médico-social em Salvador, Bahia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.21, n.2, p.67-71, 1999.

NETO, G. M.; PITOMBEIRA, M. S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Brás. Patol. Medic. Labor.**, Rio de Janeiro, v.39, n.1, p.51-56, 2003.

NNSGRC – National Newborn Screening and Genetic Resource Center (2000). Disponível em: <<http://genes-r-us.uthscsa.edu/resources/newborn/overview.htm>>. Acesso em: 30 mar. 2005.

ORLANDO, G. M.; NAOUM, P. C.; SIQUEIRA, F. A. M.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.22, n. 2, p.111-121, 2000.

OSKI, F.A.; NAIMAN, J. L. **Hematologic problems in the newborn**. Philadelphia: Saunders, 1972.

OSÓRIO, R. G. O sistema classificatório de "cor e raça" do IBGE. In: IPEA - INSTITUTO DE PESQUISA ECONÔMICA APLICADA. **Texto para discussão n.º 996**. Brasília, 2003. 53p.

PAGNIER, J.; MEARS, G.; DUNDA-BELKHODJA, O. et al. Evidence for the multicentric origin of the sickle cell hemoglobin gene in África. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, USA, v.81, p.1771-1773, 1984.

PAIVA E SILVA, R. B.; RAMALHO, A. S. Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.13, n.2, p. 285-294, 1997.

PAIVA E SILVA, R. B.; RAMALHO, A. S.; CASSORLA, R, M. S. A anemia falciforme como problema de Saúde Pública no Brasil. **Rev. Saúde Pública**, v.27, n.1, p.54-58, 1993.

PAIXÃO, M. C.; FERRAZ, M. H.; CUNHA, J. J. N.; VIANA, M. B.; LIMA J. M. Reliability of isoelectrofocusing for the detection of HbS, HbC, and HbD in a pioneering population-based program of newborn screening in Brazil. **Hemoglobin.**, v.25, n.3, p.297-303, 2001.

PAPADEA, C.; ECKMAN, J. R.; KUCHNERT, R. S.; PLATT, A. F. Comparison of liquid and dried blood for neonatal hemoglobinopathy screening: laboratory and programmatic issues. **Pediatrics**, v.93, n.3, p.427-432, 1994.

PARANÁ. Secretaria Estadual da Saúde - SESA. **Regional de saúde com seus municípios**. Disponível em: <<http://www.saude.pr.gov.br/RS/municipios.htm>>. Acesso em: 09 maio 2005.

PEARSON, H. A. Neonatal testing for sickle cell diseases: a historical and personal review. **Pediatrics**, p.815-818, 1989.

PENA, S. D. J. Razões para banir o conceito de raça da medicina brasileira. **Hist. Cienc. Saude - Manguinhos**, Rio de Janeiro, v.12, n.2, p.321-346, 2005.

PIANOVSKI, M. A. D. Editorial. **Jornal Paranaense de Pediatria**, Curitiba, v.3 n.3, p.52-53, 2002.

POWARS, D. Diagnosis at birth improves survival of children with sickle cell anemia. **Pediatrics**, v.83, n.5, p.830-833, 1989.

I SEMINÁRIO Nacional da Saúde da População Negra: A Saúde da População Negra: Ações afirmativas para avançar na equidade. Brasília: Ministério da Saúde, 2004. Disponível em: http://dtr2002.saude.gov.br/saudenegra/02_Caderno_de_Textos_B%C3%A1sicos_SNSPN_12_a_20_Agost_2004.pdf. Acesso em: 15 jul. 2005.

PROBST, C. H. et al. HLA polymorphism and evaluation of european, african and Amerindian contribution to the white and mulatto populations from Paraná, Brazil. **Human Biol.**, Michigan, v.72, n.4, p.597-617, 2000.

PRUDÊNCIO, B. C. A. B.; COVAS, D. T.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de hemoglobina S (HbS) em doadores de sangue. **Rev. Brás. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v.22, n.2, p.1-14, 2000.

R. DEVELOPMENT CORE TEAM. **A language and environment for statistical computing**. Viena, 2006. Disponível em <<http://www.r-project.org>>. Acesso em: 10 out. 2006.

RAMALHO, A. S. Hemoglobina S em doadores de sangue brasileiros. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.22, p.467-468, 1976.

_____. **As hemoglobinopatias hereditárias**: um problema de saúde pública no Brasil. São Paulo: RBG, 1986.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; GIRALDI, T. A complexidade da mistura racial no Brasil: a hemoglobina S como marcador étnico nas suas populações. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.28 n.1, p.69-70, 2006. Carta ao editor.

RAMALHO, A. S.; MAGNA, L. A.; PAIVA E SILVA, R. B. A portaria n.º 822/01 e a triagem neonatal das hemoglobinopatias. **Rev. Brás. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto, v.24, n.4, p.1-7, 2002.

_____. A portaria n.º 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.19, n.4, p.1-8, 2003.

RAMALHO, A. S.; PAIVA E SILVA, R. B. Community genetics: a new discipline and its application in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v.16, n.1, p.261-263, 2000.

RAMALHO, A. S.; PAIVA E SILVA, R. B.; TEIXEIRA R. C.; COMPRI, M. B. Hemoglobin screening: response to a Brazilian community to optional programs. **Cad. Saúde Pública**, v.15, n.3, p.591-595, 1999.

RAMALHO, A. S.; SILVA, I. D.; PAGOTTI, M.; TEIXEIRA, R. C. Abortamentos espontâneos em portadores do traço falciforme (AS). **Rev. Brás. Hematol. Hemoter.**, v.25, n.4, 2003.

REED, W.; LANE, P. A.; LOREY, F.; BOJANOWSKI, J.; GLASS, M.; LOUIE, R. R.; LUBIN, B. H.; VICHINSKI, E. P. Sick cell disease not identified by newborn screening because of prior transfusion. **J. Pediatr.**, v.136 n.2, p.248-250, 2000.

REED, W.; VICHINSKY, E. P. New considerations in the treatment of sickle cell disease. **Annu. Rev. Medicine**, v.49, p.461-474, 1998.

SAAD, S. T. O. Complicações pulmonares. In: ANVISA. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília: ANVISA, 2001a. p.124-127.

_____. Medidas gerais para tratamento das doenças falciformes. In: ANVISA. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília: ANVISA, 2001b. p.44-50.

SALAZAR-LUGO, R. La hemoglobina S en la población venezolana. **Invest. Clín.**, v.45, n.2, p.1-11, 2004.

SALOOJEE, H. In the blood: sickle cell anemia and the politics of race. **BMJ**, v.319, p.1582, 1999.

SANT'ANNA, A. L. **Triagem neonatal para hemoglobinopatias estruturais no Estado do Paraná e aconselhamento genético para os pais dos heterozigotos**. Curitiba, 2001. 316p. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

SANTOS-SILVA, M. C.; BACKES, C. E.; MALLMANN, F. G.; DASSI, T.; BAZZO, M. L. Triagem neonatal como problema de saúde pública. **Rev. Brás. Hematol. Hemoter.**, v.27, n.1, p.43-47, 2005.

SCHILIRÒ, G.; SPENA, M.; GIAMBELLUCA, E.; MAGGIO, A. Sickle hemoglobinopathies in Sicily, **American Journal of hematology**, v.33, n.2, p.81-85, 1990.

SHAFFER, F. E.; LOREY, F.; CUNNINGHAM, G. C.; KLUMPP, C.; VICHINSKY, E. Newborn screening for sickle cell disease: 4 years of experience from California's newborn screening program. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v.18, n.1, p.36-41, 1996.

SIQUEIRA, F. A. M.; FETT-CONTE, A. C.; BORIN, L. N. B.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico de hemoglobinopatias em recém-nascidos do hospital de base de São José do Rio Preto-SP. **Rev Bras. Hemato Hemoter.**, v.24, n.4, p.1-6, 2002.

SOMMER, C. K.; GOLDBECK, A. S.; WAGNER, S. C.; CASTRO, S. M. Triagem neonatal para hemoglobinopatias: experiência de um ano na rede de saúde pública do Rio Grande do Sul, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v.22, n.8, p.1709-1714, 2006.

STEINBERG, M. H. Management of sickle cell disease. **N Engl J. Med.**, v.340, n.13, p.1021-1030, 1999.

STRICKLAND, D. K.; WARE, R. E.; KINNEY, T. R. Pitfalls in newborn hemoglobinopathy screening: failure to detect β^+ -thalassemia. **J. Pediatr.**, v.127, p.304-308, 1995.

TAYLOR, M. Y.; WYATT-ASMEAD, J.; GRAY, J. et. al. Pregnancy loss after first-trimester viability in women with sickle cell trait: time for a reappraisal? **Am. Journal of Obstetrics and Gynecology**, v.194, p.1604-1608, 2006.

THERRELL, B. L. U. S. newborn screening policy dilemmas for the twenty-first century. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.74, p.64-74., 2001.

THOMPSON, J.; THOMPSON, M. **Genética médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 387p.

TORRES, F. R.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Hemoglobinas humanas-hipótese malária ou efeito materno? **Rev. Brás. Hematol. Hemoter.**, São Paulo, v.27, n.1, p.53-60, 2005.

TRENTO, A. **Do outro lado do Atlântico**: um século de imigração italiana no Brasil. São Paulo: Nobel, 1989. 205p.

VAUGHAN, J. I.; MANNING, M.; WARWICK, R. M.; LETSKY, E. A.; MURRAY, N. A.; ROBERTS, I. A. Inhibition of erythroid progenitor cells and anti-Kell antibodies in fetal alloimmune anemia. **N. Engl. J. Med.**, v.338, p.798-803, 1998.

VERMYLEN, C. Hematopoietic stem cell transplantation in sickle cell disease. **Blood Reviews**, Belgium, v.17, p.163-166, 2003.

VIANA-BARACIOLI, L. M. S.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; PAGLIUSI, R. A.; NAOUM, P. C. Prevenção de hemoglobinopatias a partir do estudo em gestantes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.23, n.1, p.31-39, 2001.

VICHINSKI, E.; HURST, D.; KLEMAN, K.; EARLES, A.; LUBIN, B. Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. **Pediatrics**, v.81, n.6, p.749-755, 1988.

WALTERS, M. C.; PATIENCE, M.; LEISENRING, W. et al. Stable mixed hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation for sickle cell anemia. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v.7, p.665-673, 2001.

WESTERMEIER, R. et al. **Electrophoresis in practice. A guide to methods and applications of DNA and protein separations**. 3.ed. Weinheim: Wiley-Vch, 2001. 349p.

WETHERS, D. L. Sickle cell disease in childhood: Part I: laboratory diagnosis, pathophysiology and health maintenance. **American Family Physician**, v.62, n.5, p.1013-11020, 2000.

WETHERS, D. L. et. al. Newborn Screening for sickle cell disease and other hemoglobinopathies. Consensus development conference statement. **JAMA**, n.4, v.258, p.1205-1209, 1987.

WHO (World Health Organization). Community control of hereditary anaemias. **Bulletin of the World Health Organization**, n.63, p.63-80, 1983.

WHO (World Health Organization). **Sickle cell anaemia**. Report by the secretariat, Executive Board 117 th session. December, 2005. 5p.

WILLIAMS, W. J.; BEUTLER, E.; ERSLEV, A. J.; RUNDLES, R. W. **Hematologia**. São Paulo: Guanabara Koogan, 1976.

WILSON, J. B.; HEADLEE, M. E.; HUISMAN, T. H. J. A new high performance liquid chromatographic procedure for the separation and quantitation of various haemoglobin variants in adults and newborn babies. **J. Labor. Clin. Med.**, v.102, p.174-185, 1983.

ZAGO, M. A. Anemia falciforme e doenças falciformes. In: BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de saúde. **Manual de Doenças mais importantes, por razões étnicas, na população brasileira afro-descendente**. Brasília (DF), 2001b.

ZAGO, M. A.; COSTA, F. F.; ISMAEL, S. J.; BOTTURA, C. Enfermedades drepanocíticas en una población brasileña. **Sangre.**, v.28, n.3, p.191-198, 1983.

ZAGO, M. A.; FIGUEIREDO, M. S.; OGO, S. H. Bantu β^s - cluster haplotype predominates among brazilian blacks. **American Journal of Physical Anthropology**, v.88, p.295-298, 1992.

ZAMARRO, P. J. A.; CANALLI, A. A.; SILVA, W. A. J.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinas semelhantes à HbS. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.38, n.4, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

EXAMES HEMATOLÓGICOS DOS PACIENTES COM DOENÇA FALCIFORME SS OU Sβ, DIAGNÓSTICADOS A PARTIR DA TRIAGEM NEONATAL PERÍODO 2002-2004

continua

PACIENTE	DN	SEXO	DIAG. PRESUNT.	ELETROFORESE Hb	A2	VCM	Hb FETAL	Hb	RETICULÓCITOS	DIAGNOSTICO
1 Pai Mãe	31.01.02	F	FS	SS AS AS	NR 2,7 2,6	88,1	8,7	6,5	36,5	SS
2 Pai Mãe	19.06.02	F	FS	SS	3,5	102,6	20,7	8,2	Nt	SS
3 Pai Mãe	20.10.02	F	FS	SS NR NR	3,3	93,7	24,9	9,4	17	SS
4 Pai Mãe	09.11.02	F	FS	SS AS AS	4,3 2,0 2,0	NC 93 90	8	7,8	NR	SS
5 Pai Mãe	02.05.03	M	FS	SS	1,8	88,5	22,6	9,4	NR	SS
6 Pai Mãe	16.09.03	F	FSA/FS	NR AS AS	2,7	95,4	16,8	7,8	11,9	SS
7 Pai Mãe	09.10.03	M	FS	SS NR AS	1,2	96,9	12,1 / 1 mês pós transf	6,7	6,3	SS
8 Pai Mãe	24.10.03	M	FS	SS NR AS	2,8	NT	14,7	NT	NT	SS

continua

PACIENTE	DN	SEXO	DIAG. PRESUNT.	ELETROFORESE Hb	A2	VCM	Hb FETAL	Hb	RETICULÓCITOS	DIAGNOSTICO
9 Pai Mãe	25.05.04	F	FS	SS AS AS	2,6	88,2	14,2	8,9	8,4	SS
10 Pai Mãe	04.12.03	F	FS	SS AS AS	2,6	77,5	12,1	8,1	21,5	SS
11 Pai Mãe	21.06.04	M	FSA	NR NR AS	3,1 2,6	87,0	9,8 0,5	5,9	14,5	SS
12 Pai Mãe	18.09.04	F	FS	SS AS AS	NR 1,4 1,6	99,2	NR 0,4 0,3	9,1	17,4	SS
13 Pai Mãe	02.04.02	M	FS	NR AS AA	3,6 1,7 6,0	67,8	25,5 0,5 1,4	9,5	12,8	SB
14 Pai Mãe	15.05.02/	M	FS	NR AA AS	3,5 5,8	67,7	30 1,0	10,3	7,1	SB
15 Pai Mãe	15.05.02	F	FS	NR	4,2	66,9	21,8	8,3	8,5	SB
16 Pai Mãe	22.06.02	M	FSA	S NR NR	5,1	67,1	12,1	10,8	Nt	SB
17 Pai Mãe	08.07.02	M	FS	SA	5,3	68,7	17	8,7	11,8	SB

conclusão

PACIENTE	DN	SEXO	DIAG. PRESUNT.	ELETROFORESE Hb	A2	VCM	Hb FETAL	Hb	RETICULÓCITOS	DIAGNOSTICO
18 Pai Mãe	28.11.02	F	FSA	S NR NR	5,2	67,6	20,1	10,7	7,7	SB
19 Pai Mãe	29.03.03	F	FS	SA NR NR	6,0	NT	12,3	NR	NR	SB
20 Pai Mãe	28.07.03	F	FSA	SA	5,2	NT	5,1	NR	NR	SB
21 Pai Mãe	14.09.03	F	FS	SA AS AA	4,0 5,0	67,5	22,3 1,6	10,9	3,5	SB
22 Pai Mãe	04.10.03	F	FS	SA AA AS	3,8	67,6	30	11,3	3,8	SB
23 Pai Mãe	14.08.04	F	FS	SA AS AS	3,9 3,4	64,8	15 0,8	8,0	10,6	SB
24 Pai Mãe	07.10.04	M	FS	SA AS AA	5,4 1,4 5,7	60,1	13,5 0,6 1,6	11,1	2,4	SB
25 Pai Mãe	01.04.04/	F	FSA/FS	NT AA AS	6,0 2,6	63,2	7,1	8,2	18,1	SB
26 Pai Mãe	18.01.04	F	FS	SA AA AS	3,7 3,2 1,6	NT	9,4 0,2 0,4	NR	NR	SB
27 Pai Mãe	28.06.03	F	FS	NR	3,4 5,7	67,8		8,9	5	SB

APÊNDICE 2

REGIONAIS DE SAÚDE COM SEUS MUNICÍPIOS - RN COM FENÓTIPOS FAS

continua

REGIONAIS DE SAÚDE/MUNICÍPIOS	FAS 2002, 2003,2004	N.º RN triados no período	%
1.ª RS Paranaguá			
Antonina	18	945	1,9
Guaraqueçaba	7	330	2,12
Guaratuba	26	1855	1,4
Matinhos	19	1230	1,54
Morretes	14	974	1,44
Paranaguá	160	9469	1,69
Pontal do Paraná	0	58	0
07 municípios			
2.ª RS Metropolitana			
Adrianópolis (VR)	0	276	0
Agudos do Sul	0	67	0
Almirante Tamandaré	31	755	4,1
Araucária	53	4775	1,1
Balsa Nova	4	235	1,7
Bocaiúva do Sul (VR)	3	132	2,2
Campina Grande do Sul	55	4345	1,26
Campo do Tenente	0	250	0
Campo Largo	76	4575	1,66
Campo Magro	1	158	0,63
Cerro Azul (VR)	7	955	0,73
Colombo	146	7430	1,96
Contenda	1	378	0,26
Curitiba	1372	108032	1,27
Doutor Ulysses (VR)	0	192	0
Fazenda Rio Grande	58	3135	1,85
Itaperuçu (VR)	13	1245	1,04
Lapa	15	2105	0,71
Mandirituba	8	1166	0,68
Piên	2	115	1,74
Pinhais	108	5477	1,97
Piraquara	60	1672	3,6
Quatro Barras	8	315	2,5
Quitandinha	1	526	0,19
Rio Branco do Sul (VR)	13	1416	0,92
Rio Negro	5	1576	0,32
São José dos Pinhais	145	11594	1,25
Tijucas do Sul	1	406	0,25
Tunas do Paraná (VR)	1	217	0,46
29 municípios			

continua

REGIONAIS DE SAÚDE/MUNICÍPIOS	FAS 2002, 2003,2004	N.º RN triados no período	%
3.ª RS Ponta Grossa			
Arapoti	16	1144	1,4
Carambei	0	14	0
Castro	41	4614	0,88
Ipiranga	2	600	0,33
Ivaí	4	570	0,7
Jaguariaíva	21	2052	1,02
Palmeira	13	2694	0,48
Piraí do Sul	31	1980	1,57
Ponta Grossa	140	17116	0,81
Porto Amazonas	4	291	1,38
São João do Triunfo	0	474	0
Sengés	11	924	1,2
12 municípios			
4.ª RS Irati			
Fernandes Pinheiro	2	69	2,9
Guamiranga	0	153	0
Imbituva	6	2454	0,24
Inácio Martins	2	528	0,38
Irati	20	4066	0,49
Mallet	0	712	0
Rebouças	4	848	0,47
Rio Azul	2	824	0,24
Teixeira Soares	2	539	0,37
09 municípios			
5.ª RS Guarapuava			
Boa Ventura de São Roque	0	22	0
Campina do Simão	0	38	0
Candói	17	1796	0,95
Cantagalo	8	817	0,98
Foz do Jordão	8	250	3,2
Goioxim	3	340	0,8
Guarapuava	118	11878	0,99
Laranjal	0	98	0
Laranjeiras do Sul	27	4110	0,65
Marquinho	0	27	0
Nova Laranjeiras	1	88	1,14
Palmital	14	1024	1,36
Pinhão	25	2053	1,21
Pitanga	28	2690	1,04
Porto Barreiro	0	0	0
Prudentópolis	15	3115	0,48
Reserva do Iguaçu	3	274	1,1
Rio Bonito do Iguaçu	0	21	0
Turvo	12	1084	1,1
Virmond	0	5	0
20 municípios			

continua

REGIONAIS DE SAÚDE/MUNICÍPIOS	FAS 2002, 2003,2004	N.º RN triados no período	%
6.ª RS União da Vitória			
Antônio Olinto	0	82	0
Bituruna	17	1683	1,01
Cruz Machado	9	1089	0,82
General Carneiro	21	1258	1,66
Paula Freitas	0	147	0
Paulo Frontin	0	258	0
Porto Vitória	0	88	0
São Mateus do Sul	21	2758	0,76
União da Vitória	42	5398	0,77
09 municípios			
7.ª RS Pato Branco			
Bom Sucesso do Sul	0	62	0
Chopinzinho	8	1488	0,54
Clevelândia	14	1207	1,16
Coronel Domingos Soares	2	318	0,63
Coronel Vivida	12	1270	0,94
Honório Serpa	7	370	1,9
Itapejara D'Oeste	4	364	1,1
Mangueirinha	17	1444	1,17
Mariópolis	2	443	0,45
Palmas	58	3827	1,52
Pato Branco	53	4985	1,06
São João	0	725	0
Saudade do Iguaçu	4	110	3,6
Sulina	2	99	2,02
Vitorino	0	205	0
15 municípios			
8.ª RS Francisco Beltrão			
Ampére	3	704	0,43
Barracão	11	824	1,33
Bela Vista da Caroba	0	62	0
Boa Esperança do Iguaçu	0	0	0
Bom Jesus do Sul	1	120	0,83
Capanema	1	1045	0,09
Cruzeiro do Iguaçu	2	84	2,3
Dois Vizinhos	12	2077	0,57
Enéas Marques	3	282	1,06
Flor da Serra do Sul	0	260	0
Francisco Beltrão	24	4706	0,51
Manfrinópolis	4	116	3,4
Marmeleiro	4	475	0,84
Nova Esperança do Sudoeste	2	227	0,9
Nova Prata do Iguaçu	3	686	0,44
Pérola D'Oeste	0	192	0
Pinhal de São Bento	0	59	0
Planalto	0	660	0
Pranchita	3	1047	0,28
Realeza	1	976	0,1
Renascença	1	106	0,94

continua

REGIONAIS DE SAÚDE/MUNICÍPIOS	FAS 2002, 2003,2004	N.º RN triados no período	%
Salgado Filho	0	220	0
Salto do Lontra	2	578	0,34
Santa Izabel do Oeste	5	564	0,9
Santo Antônio do Sudoeste	18	1284	1,4
São Jorge d'Oeste	2	476	0,42
Veré	0	318	0
27 municípios			
9.ª RS Foz do Iguaçu			
Foz do Iguaçu	490	22488	2,18
Itaipulândia	1	359	0,28
Matelândia	14	844	1,66
Medianeira	27	2507	1,07
Missal	3	447	0,67
Ramilândia	1	78	1,28
Santa Terezinha de Itaipu	26	1585	1,64
São Miguel do Iguaçu	12	1522	0,79
Serranópolis do Iguaçu	0	0	0
09 municípios			
10.ª RS Cascavel			
Anahy	2	105	1,9
Boa Vista da Aparecida	6	501	1,2
Braganey	4	198	2,02
Cafelândia	4	601	0,67
Campo Bonito	2	192	1,06
Capitão Leônidas Marques	10	1248	0,7
Cascavel	200	16903	1,18
Catanduvas	2	685	0,29
Céu Azul	1	353	0,28
Corbélia	16	667	2,4
Diamante do Sul	3	214	1,4
Espigão Alto do Iguaçu	1	208	0,48
Formosa do Oeste	6	300	2
Guaraniaçu	17	1154	1,47
Ibema	1	324	0,31
Iguatu	1	75	1,33
Iracema do Oeste	0	80	0
Jesuítas	9	199	4,5
Lindoeste	9	299	3,01
Nova Aurora	5	814	0,61
Quedas do Iguaçu	8	1528	0,52
Santa Lúcia	0	125	0
Santa Tereza do Oeste	0	58	0
Três Barras do Paraná	7	806	0,87
Vera Cruz do Oeste	4	384	1,04
25 municípios			

continua

REGIONAIS DE SAÚDE/MUNICÍPIOS	FAS 2002, 2003,2004	N.º RN triados no período	%
11.ª RS Campo Mourão			
Altamira do Paraná	5	284	1,76
Araruna	7	665	1,05
Barbosa Ferraz	28	652	4,29
Boa Esperança	4	149	2,68
Campina da Lagoa	13	664	1,95
Campo Mourão	105	5960	1,76
Corumbataí do Sul	2	108	1,85
Engenheiro Beltrão	14	460	3,05
Farol	2	80	2,5
Fênix	17	443	3,83
Goioerê	66	2377	2,77
Iretama	7	563	1,24
Janiópolis	7	248	282
Juranda	9	298	3,02
Luiziana	3	218	1,37
Mamborê	6	794	0,76
Moreira Sales	8	248	3,22
Nova Cantu	12	332	3,61
Peabiru	16	467	3,42
Quarto Centenário	4	112	3,57
Quinta do Sol	7	214	3,2
Rancho Alegre D'Oeste	5	80	6,25
Roncador	32	1109	2,8
Terra Boa	12	594	2,02
Ubiratan	15	1136	1,32
25 municípios			
12.ª RS Umuarama			
Alto Piquiri	0	138	0
Altônia	11	796	1,38
Brasilândia do Sul	0	112	0
Cafezal do Sul	1	50	2
Cruzeiro do Oeste	15	968	1,55
Douradina	13	599	2,18
Esperança Nova	1	295	2,71
Francisco Alves	8	290	2,75
Icaraima	12	218	5,5
Iporã	9	614	1,46
Ivate	2	32	6,25
Maria Helena	3	168	1,78
Mariluz	5	245	2,04
Nova Olímpia	4	240	1,66
Perobal	0	18	0
Pérola	7	362	1,93
São Jorge do Patrocínio	11	390	2,8
Tapira	6	341	1,75
Umuarama	224	7262	3
Vila Alta	0	0	0
Xambrê	0	0	0
21 municípios			

continua

REGIONAIS DE SAÚDE/MUNICÍPIOS	FAS 2002, 2003,2004	N.º RN triados no período	%
13.ª RS Cianorte			
Cianorte	64	3381	1,89
Cidade Gaúcha	5	514	0,97
Guaporema	3	72	4,1
Indianópolis	5	202	2,47
Japurá	4	436	0,91
Jussara	7	269	2,6
Rondon	3	454	0,66
São Manoel do Paraná	2	43	4,65
São Tomé	4	148	2,7
Tapejara	15	558	2,68
Tuneiras do Oeste	10	390	2,56
11 municípios			
14.ª RS Paranaíba			
Alto Paraná	12	297	4,04
Amaporã	9	235	3,82
Cruzeiro do Sul	3	223	1,34
Diamante do Norte	5	258	1,94
Guairaçá	13	317	4,1
Inajá	0	45	0
Itaúna do Sul	6	234	2,56
Jardim Olinda	1	36	2,7
Loanda	17	978	1,74
Marilena	2	286	0,7
Mirador	0	22	0
Nova Aliança do Ivaí	0	5	0
Nova Londrina	3	372	0,81
Paraíso do Norte	19	766	2,47
Paranapoema	5	104	4,8
Paranaíba	5081	5078	2,7
Planaltina do Paraná	4	225	1,7
Porto Rico	1	116	0,86
Querência do Norte	13	543	2,4
Santa Cruz do Monte Castelo	9	234	3,8
Santa Isabel do Ivaí	6	454	1,32
Santa Mônica	0	0	0
Santo Antônio do Caiuá	2	126	1,58
São Carlos do Ivaí	8	186	4,3
São João do Caiuá	9	248	3,6
São Pedro do Paraná	0	0	0
Tamboara	3	91	3,3
Terra Rica	14	619	2,26
28 municípios			
15.ª RS Maringá			
Ângulo	0	62	0
Astorga	6	974	0,61
Atalaia	3	94	3,2
Colorado	18	906	1,98
Doutor Camargo	1	106	0,94
Floraí	3	108	2,77

continua

REGIONAIS DE SAÚDE/MUNICÍPIOS	FAS 2002, 2003,2004	N.º RN triados no período	%
Floresta	4	168	2,4
Flórida	3	50	6
Iguaraçu	6	70	8,5
Itaguaí	1	198	0,5
Itambé	4	192	2,1
Ivatuba	0	72	0
Lobato	2	16	12,5
Mandaguaçu	28	779	3,6
Mandaguari	19	1208	1,57
Marialva	29	1048	2,77
Maringá	275	15336	1,79
Munhoz de Mello	3	119	2,5
Nossa Senhora das Graças	9	191	4,71
Nova Esperança	19	1296	1,46
Ourizona	8	148	5,4
Paiçandu	35	1492	2,34
Paranacity	12	414	2,9
Presidente Castelo Branco	8	196	4,1
Santa Fé	4	349	1,14
Santa Inês	0	18	0
Santo Inácio	5	146	3,37
São Jorge do Ivaí	3	99	3,03
Sarandi	60	2876	2,1
Uniflor	1	14	7,14
30 municípios			
16.ª RS Apucarana			
Apucarana	152	7348	2,06
Arapongas	108	4836	2,2
Bom Sucesso	8	232	3,5
Borrazópolis	4	332	1,2
Califórnia	1	46	2,17
Cambira	1	96	1,04
Faxinal	14	939	1,49
Grandes Rios	5	340	1,47
Jandaia do Sul	16	1179	1,35
Kaloré	1	201	0,5
Marilândia do Sul	4	77	5,19
Marumbi	4	181	2,21
Mauá da Serra	5	346	1,44
Novo Itacolomi	0	29	0
Rio Bom	0	38	0
Sabáudia	4	39	10,2
São Pedro do Ivaí	21	509	4,12
17 municípios			

continua

REGIONAIS DE SAÚDE/MUNICÍPIOS	FAS 2002, 2003,2004	N.º RN triados no período	%
17.ª RS Londrina			
Alvorada do Sul	11	363	3,03
Bela Vista do Paraíso	10	706	1,41
Cafeara	1	42	2,38
Cambé	97	3749	2,58
Centenário do Sul	21	948	2,21
Florestópolis	16	753	2,12
Guaraci	1	45	2,2
Ibiporã	68	2749	2,47
Jaguapitã	9	638	1,41
Jataizinho	4	128	3,12
Londrina	465	21909	2,1
Lupionópolis	7	294	2,4
Miraselva	4	69	5,8
Pitangueiras	0	38	0
Porecatu	34	850	4
Prado Ferreira	15	211	7,11
Primeiro de Maio	10	441	2,26
Rolândia	59	2664	2,2
Sertanópolis	16	631	2,53
Tamarana	9	798	1,12
20 municípios			
18.ª RS Cornélio Procopio			
Abatia	11	363	3,2
Andirá	49	1920	2,5
Assai	18	834	2,16
Bandeirantes	46	1442	3,19
Congonhinhas	7	431	1,62
Cornélio Procopio	69	3528	1,95
Itambaracá	6	228	2,63
Leópolis	0	9	0
Nova América da Colina	0	5	0
Nova Fátima	4	32	12,5
Nova Santa Bárbara	3	88	3,41
Rancho Alegre	2	22	9,11
Ribeirão do Pinhal	17	730	2,33
Santa Amélia	3	149	2
Santa Cecília do Pavão	9	173	5,2
Santa Mariana	6	268	2,24
Santo Antônio do Paraíso	2	83	2,4
São Jerônimo da Serra	11	469	2,34
São Sebastião da Amoreira	17	649	2,61
Sapopema	4	291	1,37
Sertaneja	1	16	6,25
Uraí	6	398	1,5
22 municípios			

continua

REGIONAIS DE SAÚDE/MUNICÍPIOS	FAS 2002, 2003,2004	N.º RN triados no período	%
19.ª RS Jacarézinho			
Barra do Jacaré	0	0	0
Cambará	34	969	3,5
Carlópolis	6	676	0,88
Conselheiro Mairinck	1	148	0,67
Figueira	7	407	1,72
Guapirama	2	69	2,9
Ibaiti	30	1308	2,3
Jaboti	0	199	0
Jacarezinho	60	2269	2,64
Japira	1	164	0,61
Joaquim Távora	3	281	1,06
Jundiá do Sul	2	74	2,7
Pinhalão	2	479	0,41
Quatiguá	5	798	0,62
Ribeirão Claro	14	604	2,3
Salto do Itararé	0	175	0
Santana do Itararé	0	189	0
Santo Antônio da Platina	35	2319	1,5
São José da Boa Vista	0	185	0
Siqueira Campos	4	904	0,44
Tomazina	7	320	2,18
Wenceslau Braz	4	936	0,42
22 municípios			
20.ª RS Toledo			
Assis Chateaubriand	27	1486	1,82
Diamante D'Oeste	7	216	3,24
Entre Rios do Oeste	0	110	0
Guaira	32	1598	2
Marechal Cândido Rondon	23	238	9,6
Maripá	1	160	0,62
Mercedes	1	68	1,47
Nova Santa Rosa	2	227	0,88
Ouro Verde do Oeste	1	92	1,08
Palotina	20	1878	1,06
Pato Bragado	1	140	0,71
Quatro Pontes	2	57	3,5
Santa Helena	10	1040	0,96
São José das Palmeiras	4	169	2,36
São Pedro do Iguazú	10	181	5,52
Terra Roxa	6	668	0,89
Toledo	139	6371	2,18
Tupãssi	6	422	1,42
18 municípios			

conclusão

REGIONAIS DE SAÚDE/MUNICÍPIOS	FAS 2002, 2003,2004	N.º RN triados no período	%
21.ª RS Telêmaco Borba			
Curiúva	6	669	0,89
Imbaú	14	273	5,12
Ortigueira	13	944	1,37
Reserva	33	1610	2,05
Telêmaco Borba	85	5592	1,5
Tibagi	9	532	1,69
Ventania	3	450	0,66
07 municípios			
22.ª RS Ivaiporã			
Arapuã	0	0	0
Ariranha do Ivaí	2	85	2,35
Cândido de Abreu	19	872	2,17
Cruzmaltina	1	35	2,85
Godoy Moreira	3	159	1,88
Ivaiporã	39	2859	1,36
Jardim Alegre	4	510	0,78
Lidianópolis	3	75	4
Lunardelli	7	248	2,82
Manoel Ribas	2	740	0,27
Mato Rico	2	67	2,98
Nova Tebas	2	670	0,3
Rio Branco do Ivaí	3	183	1,63
Rosário do Ivaí	4	309	1,29
Santa Maria do Oeste	3	790	0,38
São João do Ivaí	4	465	0,86
16 municípios			

ANEXOS

ANEXO 1**TERMO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA**

HOSPITAL DE CLÍNICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Curitiba, 01 de julho de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)
Alexandra Mitiru Watanabe
Nesta

Prezada Pesquisadora:

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "PREVALÊNCIA DA ANEMIA FALCIFORME NO ESTADO DO PARANÁ", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 28 de junho de 2005. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Ministério da Saúde.

CAAE: 0068.0.208.089-05
Protocolo CEP: 138ext006/2005-06

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 01 de janeiro de 2006.

Atenciosamente,



Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 2

FICHA DE COLETA DE SANGUE/PAPEL FILTRO

"TESTE DO PEZINHO"

FUNDAÇÃO ECUMÊNICA DE PROTEÇÃO AO EXCEPCIONAL - FEPE - (41) 262-3443
SERVIÇO DE REFERÊNCIA EM TRIAGEM NEONATAL NO PARANÁ
"TESTE DO PEZINHO"

Nº DA DECLARAÇÃO DE NASCIDO VIVO (DNV)

NOME BEM COMPLETO E LEGÍVEL DA MÃE

NOME BEM COMPLETO E LEGÍVEL DA CRIANÇA

NOME E SOBRENOME DO PAI

RUA Nº

BAIRRO DDD FONE

CIDADE UF

CEP

CÓDIGO DO HOSPITAL OU UNIDADE DE SAÚDE

NASCIMENTO - - : :

COLETA - - : :

SEXO ☐ F ☐ M

PESO (GRAMAS)

COR ☐ BRANCA ☐ PRETA ☐ AZULADA ☐ PARDINHA

FOI AMAMENTADO COM LEITE? ☐ SIM ☐ NÃO

FEZ TRANSFUSÃO? ☐ SIM ☐ NÃO

PREMATURO? ☐ SIM ☐ NÃO

FORAM GÊMEOS? ☐ SIM ☐ NÃO

ESTA É A 1ª COLETA DO BEBÊ? ☐ SIM ☐ NÃO

NOME LEGÍVEL DO COLETADOR

FRENTE

01595995

01595995

VALIDADE 31/03/2014
CONSERVE CORRENTEMENTE
SUS 903 - V031

O SANGUE DEVE PRESSIONAR OS
TUBOS PARA ABAIXO E NÃO
ANTES PARA A VENTRIS

ASSINATURA DA MÃE: _____

HOSPITAL OU UNIDADE DE SAÚDE
COMPROVANTE DE COLETA

DECLARO QUE NA DATA DE _____ FUI INFORMADA DA COLETA
DE SANGUE PARA OS TESTES DE TRIAGEM NEONATAL
OBSERVAÇÃO: O HOSPITAL OU UNIDADE DE SAÚDE DEVE GUARDAR POR
6 MESES ESTE COMPROVANTE NO PRONTUÁRIO DA MÃE OU MENOR.
CONFORME PORTARIA DO MINISTÉRIO DA SAÚDE Nº 822 DE 06/06/2001.

Nº DA DECLARAÇÃO DE NASCIDO VIVO (DNV)

www.fepe.org.br
a sua senha para impressão do resultado
via Internet é: **01595995**

FUNDAÇÃO ECUMÊNICA DE PROTEÇÃO AO EXCEPCIONAL - FEPE - (41) 262-3443
SERVIÇO DE REFERÊNCIA EM TRIAGEM NEONATAL NO PARANÁ
"TESTE DO PEZINHO" - GRATUITO MAS OBRIGATÓRIO

SRA. ENFERMEIRA,
O SANGUE DO BEBÊ FOI COLETADO COM MENOS DE 48 HS DE VIDA?
☐ SIM ☐ NÃO

NO CASO DE TER COLETADO ANTES DE 48 HORAS DE VIDA, DEVE SER
REPETIDA A COLETA E EXAME APOS 1 SEMANA NA UNIDADE DE SAÚDE MAIS
PRÓXIMA. FAVOR ORIENTAR A MÃE.
LEVAR ESTA FICHA NA UNIDADE DE SAÚDE PARA COLETAR NOVAMENTE.

INFORMATIVO AO PAIS
SEU FILHO COLETOU NA ALTA DESTA HOSPITAL ALGUMAS GOTAS
DE SANGUE ("TESTE DO PEZINHO") PARA O EXAME GRATUITO DE
CINCO DOENÇAS, CHAMADAS DE FENILCETONÚRIA, HIPOTIREOIDISMO
CONGÊNITO, HEMOGLOBINOPATIAS, FIBROSE CÍSTICA E
DEFICIÊNCIA DE BIOTINIDASE.
ELAS PODEM CAUSAR DEFICIÊNCIA MENTAL E OUTROS PROBLEMAS.
PROCURE O RESULTADO EM 15 DIAS NA SECRETARIA DA ENTIDADE ONDE
COLETOU O SANGUE E DEIXOU O ENDEREÇO.

REPITA O EXAME QUANDO SOLICITADO - É GRATUITO E IMPORTANTE

VERSO

ANEXO 3

TESTES ESTATÍSTICOS - TESTE DE MCNEMAR

O teste de McNemar é um teste não-paramétrico utilizado para analisar situações do tipo antes-depois onde cada indivíduo é observado duas vezes: "antes e depois" de um certo tratamento e deseja-se testar a eficiência do tratamento. Cada indivíduo se encaixa em uma das duas categorias de resposta, antes e depois do tratamento. Este teste avalia a mudança de uma categoria para outra. No caso desta análise iremos observar se o tratamento (técnica laboratorial) é eficiente para verificar a doença.

Temos duas amostras para validar ou não a técnica laboratorial:

- Tabela 1 – SS Anemia falciforme
- Tabela 2 – Interação S β

Teste para Tabela 1 – SS Anemia falciforme

Portanto temos para o estudo a seguinte hipótese:

- H₀: O teste presuntivo não-difere do teste confirmatório
- H₁: O teste presuntivo difere do teste confirmatório

ANTES x DEPOIS	SS	NÃO SS
FS	10	0
Não FS	2	0

Conclusão: O p-valor para esta análise foi exatamente 0,1573. Portanto não rejeitamos H₀ e podemos dizer com 95% de confiança que o resultado obtido no teste presuntivo é igual ao teste confirmatório.

Teste para Tabela 2 – Interação S β

Portanto temos para o estudo a seguinte hipótese:

- H₀: O teste presuntivo não-difere do teste confirmatório
- H₁: O teste presuntivo difere do teste confirmatório

ANTES x DEPOIS	S β	NÃO S β
FS	11	0
Não FS	4	0

Conclusão: O p-valor para esta análise foi exatamente 0.0455 Portanto não rejeitamos H₀ e podemos dizer com 95% de confiança que o resultado obtido no teste presuntivo é igual ao teste confirmatório.

ANEXO 4

TESTES ESTATÍSTICOS - TESTE DE KRUSKAL WALLIS

Este teste é utilizado para comparação de k tratamentos independentes e nos indica se há diferença entre pelo menos um par de tratamentos quando comparados entre si. A exigência para fazer o teste é que o nível de mensuração deve ser em escala ordinal

Teste para Tabela 3 - Cor de pele

Vamos verificar se algum dos pares abaixo são diferentes entre si.

- branco-negro
- branco-amarelo
- branco-pardo
- branco-NA
- negro-amarelo
- negro-pardo
- negro-NA
- amarelo-pardo
- amarelo-NA
- pardo-NA

Portanto temos para o estudo a seguinte hipótese:

- H_0 : Não existe diferença de prevalência entre as cores de pele.
- H_1 : Existe pelo menos um par de prevalência diferente dos demais.

Conclusão: O p-valor para esta análise foi menor que 0,05. Portanto rejeitamos H_0 e podemos dizer com 95% de confiança que existe pelo menos um par de cores de pele que diferem entre si.

Para descobrirmos qual é o maior contraste entre os pares comparados no estudo devemos fazer um teste de comparação de médias, ou seja, ao fazer o teste de comparação de média poderemos analisar exploratoriamente quais cores de pele que possuem prevalências significativamente diferentes entre si. Utilizamos no caso a estatística DMS que terá por objetivo nos dizer quais são as cores de pele que são diferentes entre si.

Após o teste podemos fazer uma análise exploratória e observar que existe uma divergência muito grande entre as cores branca e negra. Observando a prevalência da doença em brancos e em negros podemos dizer que a doença é predominante na raça negra, pois o valor da prevalência na raça negra é a maior quando comparada com as demais cores de pele e em contrapartida a raça branca possui o menor valor de prevalência

indicando que a doença não é predominante na raça branca. A tabela abaixo ilustra melhor o pareamento das cores de pele e facilita a análise exploratória do estudo.

RESULTADOS OBTIDOS NA COMPARAÇÃO ENTRE OS PARES DE
CORES DE PELE

branco-negro	Difere
branco-amarelo	Difere
branco-pardo	Difere
branco-NA	Difere
negro-amarelo	Difere
negro-pardo	Difere
negro-NA	Difere
amarelo-pardo	Não difere
amarelo-NA	Não difere
pardo-NA	Não difere

ANEXO 5

TEOREMA HARDY-WEINBERG

GENÓTIPO	RECÉM-NATO	GENES
SS	12	24
Sβ	15	15
SC	18	18
SA (SHope)	1	1
AS	8321	8321
AA (+AD,AE....)	540.443	
TOTAL	548.810	8379

Frequência do gene da HbS; $S = 8.379 \text{ genes} / (548.810 \times 2) = 0,76\% = \mathbf{0,0076}$

Frequência dos demais genes = $100\% - 0,76\% = \mathbf{99,24\%}$

Esperado pelo teorema de Hardy-Weinberg:

$$SS = (0,0076)^2 \times 548.810 = \mathbf{31,70}$$

$$S \text{ Não} S = [(1-0,0076) \times 0,0076 \times 2] \times 548810 = \mathbf{8.278,51}$$

$$\text{Sem } S = [(1-0,0076)^2 \times 548.810] = \mathbf{540.499,79}$$

Total = 548.810

χ^2 com GL= 1; total de classes = 3, porém perde 1 GL por causa do total da amostra e outro GL porque foi usada a frequência do alelo S (0,0076), estimada para essa população.

Resultado: $\chi^2 = 12,974$, e GL=1. Verificando-se esse valor na tabela de χ^2 , encontramos $p < 0,001$, valor significativo, que nos leva a interpretar que a distribuição desses genótipos não se dá de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg. Observando-se os desvios, percebe-se que o desvio significativo foi o da classe SS, que mostrou falta de SS observados em relação aos esperados. Nessa amostra populacional seriam esperados cerca de 32 homozigotos.

CLASSE	OBSERVADO (o)	ESPERADO (e)	DESVIO (d) (o – e)	d^2/e
SS	12	31,70	-19,70	12,243
S---	8355	8.278,51	76,49	0,707
Sem S	540.443	540.499,79	-56,79	0,006
TOTAL	548.810	548.810	0,00	$\chi^2 = \mathbf{12,956}$

ANEXO 6

CÁLCULO DO N.º DE CASOS SS PELO TEOREMA DE HARDY- WEIMBERG

(com os dados do quadro 1)

MINAS GERAIS

CLASSE	OBSERVADO (o)	GENE S	ESPERADO/TEÓRICO DOS GENÓTIPOS (e)
SS	46	92	36,2
AS	4.222	4.222	4.239,3
(AA)Sem S	124.058	0	124.050,5
TOTAL	128.326	4.314	128.326

$$f_S = \frac{4.314 \text{ genes}}{(128.326 \times 2)} = 0,0168 = \mathbf{1,68\%} \quad f \text{ demais genes} = \mathbf{(1-1,68) = 98,32\%}$$

- Esperado SS= $(0,0168)^2 \times 128.326 = \mathbf{36,2}$
- Esperado AS: $((1-0,0168) \times 0,0168 \times 2) \times 128.326 = \mathbf{4.239,3}$
- Esperado sem S (AA): $(1-0,0168)^2 \times 128.326 = \mathbf{124.050,5}$

RIO GRANDE DO SUL

CLASSE	OBSERVADO (o)	GENE S	ESPERADO/TEÓRICO DOS GENÓTIPOS (e)
SS	1	2	3,8
AS	1337	1337	1.329,8
(AA)Sem S	115982	0	115.986,4
TOTAL	117320	1339	117.320

$$f_S = \frac{1339 \text{ genes}}{(117.320 \times 2)} = 0,0057 = \mathbf{0,57\%} \quad f \text{ demais genes} = \mathbf{99,43\%}$$

- Esperado SS= $(0,0057)^2 \times 117.320 = \mathbf{3,8}$
- Esperado AS: $((1-0,0057) \times 0,0057 \times 2) \times 117.320 = \mathbf{1.329,8}$
- Esperado sem S (AA): $(1-0,0057)^2 \times 117.320 = \mathbf{115.986,4}$